



# Etude de l'effet antitumoral de l'activation de la NO-synthase inductible dans un modèle de cancer du sein : analyse des mécanismes moléculaires

Myriam Lamrani

## ► To cite this version:

Myriam Lamrani. Etude de l'effet antitumoral de l'activation de la NO-synthase inductible dans un modèle de cancer du sein : analyse des mécanismes moléculaires. Cancer. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS091 . tel-01289827

**HAL Id: tel-01289827**

**<https://theses.hal.science/tel-01289827>**

Submitted on 17 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE U.F.R DE MEDECINE

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque :

***THESE***

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

*DISCIPLINE : SCIENCES DE LA VIE*

*SPECIALITE : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE*

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 28 OCTOBRE 2013

PAR

**MYRIAM LAMRANI**

**ETUDE DE L'EFFET ANTITUMORAL DE L'ACTIVATION DE LA NO-SYNTASE INDUCTIBLE DANS UN MODELE DE CANCER DU SEIN :  
ANALYSE DES MECANISMES MOLECULAIRES**

Directeur de thèse :

**ALI BETTAIEB**

**MEMBRES DU JURY :**

Dr. Fawzia LOUACHE

Rapporteur

Dr. Fabrice COGNASSE

Rapporteur

Dr. Isabelle COSTE

Examineur

Dr. Dominique DELMAS

Examineur

Pr. Ali BETTAIEB

Directeur de thèse

*Je dédie cette thèse à mes parents,*

# Remerciements

Je remercie vivement les **membres du jury**, examinateurs et rapporteurs, pour me faire l'honneur de juger mon travail. Merci aux docteurs **Fawzia Louache** et **Fabrice Cognasse** pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie les docteurs **Isabelle Coste** et **Dominique Delmas** pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens tout d'abord à remercier monsieur **Eric Solary**, ex-directeur du Centre de Recherche Inserm (CRI) U866 et monsieur **Laurent Lagrost**, pour m'avoir accueillie au sein de cette unité.

Merci à **Ali Bettaieb**, directeur d'étude à l'EPHE, et mon directeur de thèse. Tu es un peu comme mon papa scientifique, je te remercie d'abord pour m'avoir soutenu et pour m'avoir encouragé à continuer en thèse. Merci pour tous tes conseils et toutes les idées de manipulation que tu m'as suggéré. Merci pour ta gentillesse, ton humour, ta disponibilité et tes petites tapes affectives qui parfois me laissent des traces rouges sur l'épaule (elles vont beaucoup me manquer). Cette thèse c'est grâce à toi en partie si elle s'est bien passé, tu m'as donné des responsabilités, tu m'a surtout fais confiance et j'espère que tu ne t'en mords pas les doigts aujourd'hui !

Je remercie particulièrement **Jean-François Jeannin**, directeur d'étude à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, pour m'avoir permis de suivre mon master au sein de son équipe. Je le remercie pour m'avoir fait confiance dans mes travaux et permis de conforter mon gout pour la recherche.

Merci à **Catherine Paul**, maitre de conférences à l'EPHE. Notre histoire a commencé en master, et oui souviens toi tu étais ma tutrice scientifique. Je te remercie pour m'avoir encadrée pendant ces deux années de master et avoir continué avec moi sur le projet lipide A pendant ma thèse. Merci pour ta patience, ton écoute et pour avoir pris le temps de répondre à mes questions. Merci pour tous tes sourires, ton humour et ta gentillesse.

Je tiens à remercier **Néjia Sassi**, ancienne doctorante de notre équipe, pour m'avoir formé à la plus grande partie des techniques que j'utilise aujourd'hui. Merci pour tous tes conseils qui me sont toujours très utile.

Merci à **Jérôme Labbé**, notre ancien « technicien de recherche de luxe », pour sa bonne humeur et pour ses compétences multiples. Il a vite été remplacé par une nouvelle technicienne, **Cindy Racoeur-Godard**. Merci à toi pour ton aide en *in vivo*, pour ta gentillesse, ta bonne humeur et surtout ta diplomatie. On a passé pas mal d'heures à l'animalerie, pas mal de week-end aussi, c'était vraiment agréable de travailler avec toi.

Je remercie chaleureusement **Lissbeth**, pour tous les bons moments passé ensemble à mettre au point la technique du « Biotine Switch Assay », mais surtout pour les pauses Mc DO afin de décompresser après un BSA! Merci pour ta gentillesse, ta sympathie et ton amitié. Ton départ du labo m'a laissé un vide mais heureusement le turnover était efficace et la venue de Sabrina est venue combler un peu tout ça.

Merci à **Sabrina**, d'une pour ta venue et de deux parce que je te kiff ! (c'est ton expression favorite en ce moment). Merci pour l'aide que tu m'as apporté sur le projet Ubc, je sais que ce n'est pas toujours facile, mais tu es une warrior ! Merci aussi pour tes talents de mise en page, qui m'ont été utile en cette fin de thèse et merci pour ton amitié qui je pense va durer. Je te kiff !

Je remercie ma petite **Léa**, pour ta voix si douce et ton vocabulaire si... Merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse.

**Rahamata**, merci pour tout, pour tes conseils, pour ta sympathie et ton franc parler bien direct (un peu comme moi!).

**Carla**, tu es toute nouvelle au labo, mais je t'aime bien, t'es rigolote ! Merci pour tes corrections de français pendant la rédaction de mon manuscrit.

Merci à tous les membres de l'équipe « NO et Cancer », les anciens et nouveaux : **Véronique, Stéphanie, Olivier, Kumar, Alessandra, Nicolas, Fouzia, Rahamata, , Hanaa, Nabil, la petite Amandine, , Maria (la petite nouvelle)**. Je les remercie pour leur sympathie, leur aide et leur bonne humeur générale.

Je remercie toutes les personnes qui ont apporté leur aide pour le déroulement de mon projet de thèse. Merci à **Jean-Luc Boucher** (paris Descartes) pour son aide en chimie du NO, je le remercie pour tous ces conseils en RPE et surtout pour ces compétences. Merci également à Monsieur **Luc Rochette** pour ses conseils et compétences sur le stress oxydatif. Merci à tous les membres de l'animalerie, à ceux de la plateforme de cytométrie en flux, à ceux de la plateforme de protéomique

Merci à **Naïma Benikhlef, Malika Trad, Aziza Aznague, Sébastien Morel, Mélanie Bruchard, Jessica Gobbo** et le trio **Ahmed Habbout, Arthur Marivin (allias Atchoum), Jean Berthelet (allias Juan Carlos de la Vega)** pour leur amitié. Je tiens à adresser mes remerciement à tous les membres de l'U866 (anciens et nouveaux) qui ont, chacun, imprégnés ma thèse à leur manière. Car une thèse prend aussi toute sa richesse et son sens dans l'entraide et la communication.

Merci à mes frères, **Farid** (j'ai puisé en toi mon goût pour les sciences), **Rachid** (j'admire ta culture, ta curiosité et ton intelligence), **Youness** (si tout le monde était comme toi le monde irait beaucoup mieux), **Hakim** (mon jumeau, avoue que tu ne peux pas te passer de Myriam !) et **Ismaël** (mon petit dernier très affectif), et ma sœur **Nadia** (t'es non seulement ma sœur, mais aussi ma confidente, ma meilleure amie). Je les remercie pour leurs soutiens inconditionnel, leurs encouragements, leur affection et surtout leur patience pour toute ces années passées à mes coté.

Merci à **Karim**, pour ta patience, ton affection et maintenant à ton tour de me subir !

Je tiens finalement mais surtout à remercier **ma mère et mon père** pour avoir donné un sens à ma thèse. Si j'ai pu rester motivé jusqu'au bout c'est grâce à vous et pour vous. Je vous dois tous, la meilleure des reconnaissances à mes yeux c'est la vôtre. Merci pour m'avoir toujours encouragé et guider pour atteindre mes objectifs. Je les remercie pour leur soutien sans faille et leur affection. Merci pour votre force qui m'a toujours fait avancer, merci pour tous les sacrifices que vous faite pour nous chaque jours.

## Résumé

L'effet anti-tumoral d'un lipide A, l'OM-174 (partie lipidique des lipopolysaccharides) a été étudié dans un modèle de cancer mammaire chez la souris. *In vivo*, l'OM-174 augmente la survie de la souris alors qu'*in vitro* il n'est pas toxique pour les cellules cancéreuses. L'OM-174 se lie au récepteur TLR4 des cellules immunitaires induisant la production de cytokines comme l'IFN $\gamma$ . *In vitro*, l'association de cette cytokine au lipide A est cytotoxique. L'objectif de cette thèse est d'en analyser les mécanismes moléculaires. Nous avons montré, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, que la cytotoxicité du lipide A/IFN $\gamma$  est dépendante du TLR4, du récepteur à l'IFN $\gamma$  et de l'expression de la NOS II. Nous avons également montré que les espèces radicalaires, NO et anion superoxyde formant le peroxynitrite jouent un rôle crucial dans cette cytotoxicité. L'origine de ces espèces radicalaires se trouve être la NOS II selon un processus de découplage enzymatique. Nous avons également cherché d'autres mécanismes associés pouvant expliquer la cytotoxicité du lipide A/IFN $\gamma$ . Nous avons ensuite montré que le NO est capable de réagir avec les résidus cystéine de certaines protéines, un processus appelé S-nitrosylation. Une analyse protéomique nous a permis d'identifier au moins une dizaine de protéines qui sont S-nitrosylées dans les cellules cancéreuses mammaires en réponse au lipide A/IFN $\gamma$ . Nous avons étudié l'impact de cette modification sur la fonction d'une des ces protéines, l'enzyme de conjugaison E2 de l'ubiquitine Ubc13, une protéine impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire. Nous avons confirmé la nitrosylation d'Ubc13 et identifié la cystéine 87 comme cible du NO. L'expression d'une forme mutée d'Ubc13 (remplacement de la cystéine 87 par une alanine) inhibe l'auto-ubiquitination de l'enzyme et sa capacité à ubiquitiner une de ses cibles I $\kappa$ B $\alpha$ . Nous avons montré que la S-nitrosylation d'Ubc13 induit sa migration vers le noyau et rend les cellules plus sensibles à l'effet cytotoxique du lipide A/IFN $\gamma$ . En résumé, nos résultats révèlent un rôle majeur et insoupçonné de la NOS II et du NO dans l'effet antitumoral du lipide A OM-174 dans un modèle de cancer mammaire chez la souris ouvrant la voie pour la conception de nouveaux traitements anticancéreux.

Mots clés: TLR4, monoxyde d'azote, NOS II, lipide A, S-nitrosylation, Ubc13, effet anti-tumoral

## Abstract

The anti-tumor effect of a lipid A, OM-174 (lipid portion of LPS) was studied in a model of breast cancer in mice. *In vivo*, OM-174 increases the survival of mice whereas *in vitro* it is not toxic to cancer cells. OM-174 binds to TLR4 immune cells inducing the production of cytokines such as IFN $\gamma$ . *In vitro*, the combination of IFN $\gamma$  to lipid A is cytotoxic. The objective of this thesis is to analyze those molecular mechanisms. We have shown both *in vitro* and *in vivo* that the cytotoxicity of the lipid A / IFN $\gamma$  is dependent of TLR4 and of the receptor for IFN $\gamma$ , and the NOS II expression. We also showed that the radical species, NO and superoxide anion forming peroxynitrite play a crucial role in this cytotoxicity. The origin of these radical species is being NOS II enzyme in a process of decoupling. We also looked for other associated mechanisms that may explain the cytotoxicity of lipid A / IFN $\gamma$ . We then showed that NO is able to react with the cysteine residues of certain proteins, a process called S-nitrosylation. A proteomic analysis allowed us to identify at least a dozen proteins that are S-nitrosylated in breast cancer cells in response to lipid A / IFN $\gamma$ . We studied the impact of this change on the basis of one of these proteins, the E2 conjugating enzyme UBC13 ubiquitin, a protein involved in cell proliferation and survival. We confirmed the UBC13 nitrosylation on cysteine 87 and identified as a target of NO. The expression of a mutant of UBC13 (replacement of cysteine 87 with alanine) forms inhibits the auto-ubiquitination of the enzyme and its ability to ubiquitinylated one of its targets I $\kappa$ B $\alpha$ . We have shown that S-nitrosylation of UBC13 induced its translocation to the nucleus and greater sensitivity to the cytotoxic effect of lipid A / IFN $\gamma$  in cells. In summary, our results reveal an important and unexpected role of NOS II and NO in the antitumor effect of lipid A OM-174 in a model of breast cancer in mice opening the way for the development of new cancer treatments.

Keywords: TLR4, nitric oxide, NOS II, lipid A, S-nitrosylation, Ubc13, anti-tumor effect



# Table des matières

## Table des matières

REMERCIEMENTS .....	3
RESUME .....	6
ABSTRACT .....	7
TABLE DES MATIERES .....	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	10
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....	14
CHAPITRE I : INTRODUCTION .....	16
I.    LE CANCER DU SEIN.....	16
1.    Epidémiologie .....	16
2.    Dépistage.....	18
3.    Facteurs de risques .....	18
4.    Inflammation et cancer du sein .....	19
5.    Les différents types de cancers du sein .....	20
6.    Classification anatomo-clinique des cancers du sein (pour revue, Espié et Gorins, 2001).....	22
7.    Les traitements .....	23
II.    IMMUNOTHERAPIE ANTI-TUMORALE ET LIPIDE A .....	27
1.    L'immunothérapie anti-tumorale .....	27
2.    L'immunothérapie par les LPS .....	29
3.    Signalisation du lipide A.....	32
4.    Interaction $IFN\gamma$ et TLR.....	39
III.    LE MONOXYDE D'AZOTE (NO) .....	41
1.    Généralité sur le NO.....	41
2.    Production de NO.....	42
3.    Les thérapies via le NO.....	53
4.    Mécanismes moléculaire du NO .....	55
5.    Modifications post-traductionnelles des protéines induites par le NO.....	59
IV.    UBC13 : UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME (E2N).....	67
1.    Signalisation des ubiquitine enzymes .....	67
2.    Pathologies associées au système d'ubiquitination.....	70
3.    Caractéristiques d'Ubc13.....	71
CADRE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL .....	78
CHAPITRE II : RESULTATS .....	81
UNCOUPLED INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN TUMOR CELLS PRODUCES PEROXYNITRITE TO MEDIATE THE ANTITUMORAL RESPONSE INDUCED BY TLR4 AGONIST .....	85
ANALYSE PROTEOMIQUE DE LA S-NITROSYLATION DANS L'EFFET ANTI-TUMORAL D'UN ANALOGUE DU LIPIDE A : IMPORTANCE D'UBC13 .....	128

I.	PRESENTATION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	128
II.	RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	130
1.	<i>Identification des protéines S-nitrosylées par le lipide A et IFN<math>\gamma</math> dans les cellules cancéreuses mammaires.....</i>	130
2.	<i>Confirmation de la S-nitrosylation de l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 Ubc13 et identification de la cystéine cible.....</i>	131
3.	<i>Le NO affecte l'ubiquitination d'Ubc13 par S-nitrosylation .....</i>	132
4.	<i>La S-nitrosylation d'Ubc13 affecte sa capacité à ubiquitiner ses cibles.....</i>	134
5.	<i>Implication d'Ubc13 dans l'effet cytotoxique du lipide A/IFN<math>\gamma</math> ou d'un donneur de NO.....</i>	135
III.	MATERIELS ET METHODES.....	138
	<b>CHAPITRE III : DISCUSSION .....</b>	<b>146</b>
1.	<i>Implication du TLR4 de la cellule cancéreuse et de l'hôte.....</i>	146
2.	<i>Mécanismes de cytotoxicité de la NOS II .....</i>	151
3.	<i>Effet de la S-nitrosylation sur la fonction de l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2, Ubc13. ....</i>	152
	<b>ANNEXE.....</b>	<b>155</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>156</b>
	<b>COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES .....</b>	<b>176</b>
	<b>PUBLICATIONS .....</b>	<b>177</b>

## Liste des abréviations

Ac : Anticorps  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
Ag : Aminoguanidine  
ALA: Analogue de Lipide A  
ALDH : glycéraldéhyde déshydrogénase  
AP-1: Adaptator Protein 1  
ARG: Arginase  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARNm : Acide RiboNucléique messenger  
ASK 1: Apoptosis Signal regulating Kinase 1  
B2-AR: Beta-2 adrenergic receptor  
BARD1: BRCA1-associated RING domain protein 1  
BCG: Bacille de Calmette et Guérin  
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2 protein  
BCR: B-cell receptor  
BH4: 6-5, 6, 7, 8-Tetrahydrobiopterine  
BIR: Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat  
BRCA1: Breast Cancer 1  
BSA: Sérum Albumine Bovine  
CaM: Calmoduline  
CAT: Cationic Amino acid Transporter  
CD: Cluster of Differentiation  
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CPA: Cellule présentatrice d'Antigène  
c-PTIO: [2- (4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide]  
Cys: Cystéine  
CysNO: nitrosocystéine  
DAMP: Danger Associated Molecular Patterns  
DC: Dendritic Cell  
DCFH2-DA: 2',7',-dichlorodihydrofluoresceine diacétate  
DHE: Dihydroéthidium  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DMSO: Diméthylsulfoxyde  
DUB: DéUBiquitinase  
EDRF: Endothelium Derived Relaxing Factor  
EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétraacétique  
EGF: Epidermal Growth factor  
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor  
EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium  
EPR: Electron Paramagnetic Resonance  
EPS15: Epidermal growth factor receptor substrate 15

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase  
 FACS: Cytométrie en flux  
 FAD: Flavine Adenine Dinucleotide  
 FAS-L: Fas Ligand  
 FeTPPS: 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)prophyrinato iron (III) chloride  
 FITC: Fluoresceine IsoThioCyanate  
 FMN: Flavine adénine MoNonucleotide  
 GAPDH: GlycerAldéhyde-3-Phosphate DesHydrogénase  
 GFP: Green Fluorescent Protein  
 GMP: Guanosine MonoPhosphate  
 GSH: Glutathion  
 GSNO: S-Nitrosoglutathione  
 GTN: Glyceryl TriNitrate  
 HBSS: Hank's Balanced Salt Solution  
 HCl: Hydroxyde Chloride  
 HDAC: histones désacétylase  
 HECT: Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus  
 HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2  
 HIF-1 $\alpha$ : Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$   
 HLA: human leukocyte antigen  
 HMGB1: High-mobility group protein B1  
 IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein  
 ICAD: Inhibitor of Caspase Activated DNase  
 IFNGR: IFN $\gamma$  Receptor  
 IFN- $\gamma$ : Interferon  $\gamma$   
 Ig: Immunoglobuline  
 IL: Interleukine  
 IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$   
 IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase  
 ISDN: IsoSorbide DiNitrate  
 I $\kappa$ B: Inhibitor of NF- $\kappa$ B  
 JAK: Janus Kinase  
 K: Lysine  
 KCIP: Kinase C Inhibitor Protein-1  
 KDa: Kilo Dalton  
 LBP : LPS Binding Protein  
 LH-RH: Luteinizing Hormone Releasing Hormone  
 L-NAME: N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginine Methyl Ester  
 L-NIL : L-N-Iminoethyl lysine  
 L-NIO: N-Iminoethyl-L-Ornithine  
 L-NMMA: N<sup>G</sup>-MonoMethyl-L-Arginine  
 LPS: LipoPolySaccharide  
 MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase  
 MD2: Myeloid Differentiation protein 2

MDM2: Mouse double minute 2 homolog  
 MIR1: modulator of immune recognition  
 MKK: MAP Kinase Kinase  
 MMP: Matrice Metalloprotéinase  
 MnSOD : Manganèse SuperOxyde Dismutase  
 mtNOS: NOS mitochondriale  
 MyD88: Myeloïd Differentiation factor 88  
 NAC : N-acétyl-L-cysteine  
 NaCl: Chlorure de Sodium  
 NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
 NaOH: Hydroxide de sodium  
 NEMO: NF- $\kappa$ B Essential Modulator  
 NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor- $\kappa$ b  
 NIK:Nck Interacting Kinase  
 NK: Natural Killer  
 NKT: lymphocyte Natural Killer T  
 NO: Monoxyde d'azote  
 NOS : Monoxyde d'Azote Synthase  
 ONOO: Péroxinitrite  
 PAF-1: Platelet Activating Factor  
 PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern  
 PBS : Phosphate Buffer Saline  
 PRR: Pattern Recognition Receptor  
 PSA: (Prostate-Specific Antigen)  
 PTEN: Phosphatase and TENsin homolog  
 RAG: Recombinaison Activating Gene  
 RHD: Rel homology domain  
 RING: Really Interesting New Gene  
 RIP: Receptor-Interacting Protein  
 RNOS: Reactive Nitrogen Oxide Species  
 RNS: Reactive Nitrogen Species  
 ROS: Reactive oxygen Species  
 SCF: Skp, Cullin, F-box containing complex  
 SDRP: récepteur de reconnaissance de forme  
 SDS: Sodium Dodecyl Sulfate  
 sGC: Guanylate Cyclase soluble  
 SH2: Src Homology 2 Domain  
 shRNA: small herpin RNA  
 SIN-1: 3-morpholinosydnonimine hydrochloride  
 siRNA: small interferent ARN  
 SNAP: S-nitroso-N-AcetylPenicillamine  
 SNP: Sodium nitropruside  
 SOD: SuperOxyde Dismutase  
 SOD: SuperOxyde Dismutase  
 STAT: Signal Transducers and activators of transcription  
 STAT-1: Signal Transducers and Activators of Transcription

SVF: Sérum de Veau Foetal  
 TAD: Transcription Activating Domain  
 TAM: Tumor Associated macrophages  
 TCR: T-cell receptor  
 TGF: Tumor Growth Factor  
 TIR: Toll Interleukine-1 Receptor  
 TIR: Toll IIL-1 receptor  
 TIRAP: TIR domain containing adaptator protein  
 TLR: Toll Like Receptor  
 TNF: Tumor Necrosis Factor  
 TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
 TRAF : TNF Receptor-Associated Factors  
 TRAM: TRIF related adaptator molecule  
 TRIF: TIR domain containing adaptator protein inducing IFN- $\beta$   
 Trx/TR: Thioredoxine  
 Tween-20: polyethylene-sorbitan-monolaurate  
 Ub: Ubiquitine  
 UBA: ubiquitin-associated domains  
 Ubc13: ubiquitin-conjugating enzyme E2N Ubc13  
 UBD: Ubiquitin-binding domains  
 UEV: ubiquitin E2 Variant  
 UEV1A: Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant 1a  
 UIM: Ubiquitin interacting Motifs  
 VEGF: Vascular endothelial growth factor  
 XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

## Liste des figures et tableaux

<b>Figure 1:</b> Disparité géographique mondiale des taux d'incidence du cancer du sein chez la femme en 2011.....	17
<b>Tableau 1:</b> Principaux facteurs de risques de cancer du sein.....	14
<b>Tableau 2 :</b> La classification TNM.....	21
<b>Figure 2 :</b> Cancérisation de la glande mammaire : exemple du carcinome canalaire. ....	23
<b>Tableau 3 :</b> Principaux agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement des cancers du sein. Source Mignot et Morvan (Mignot and Morvan 1996). ....	25
<b>Figure 3:</b> caractéristiques de la cellule tumorale ou « Hallmarks of cancer ». ( <i>D'après Hanahan et al, 2011</i> ).....	28
<b>Figure 4:</b> Architecture des LPS et structure chimique de l'analogue de lipide A OM-174.....	31
<b>Figure 5:</b> les TLRs et leurs ligands. <i>Source : (Takeda and Akira 2005)</i> . ....	34
<b>Figure 6:</b> Les voies de signalisation de TLR4. ....	36
<b>Figure 7:</b> Représentation schématique des récepteurs aux interférons (IFN) de types I et II. ....	37
<b>Figure 8:</b> Représentation schématique de l'interaction entre la signalisation des TLR et de l'IFN $\gamma$ : importance de la molécule MyD-88. <i>Source : (Han 2006)</i> .....	39
<b>Figure 9:</b> les réactions de réduction et d'oxydation du NO.....	41
<b>Figure 10:</b> donneurs de NO endogènes et exogènes.....	43
<b>Figure 11:</b> schéma réactionnel de la production de NO à partir de L-arginine par les NOS (Vallance and Leiper 2002) .....	44
<b>Figure 12:</b> schéma de la formation de l'hétérodimère de la NOS II (Vallance and Leiper 2002).....	46
<b>Figure 13:</b> induction de la NOS II dans le macrophage murin après stimulation par l'IFN $\gamma$ et les LPS. ....	47
<b>Figure 14:</b> schéma de découplage enzymatique des NOS.....	51
<b>Figure 15:</b> Principaux effets du NO à faible et forte concentration.....	58
<b>Figure 16:</b> les modifications post-traductionnelles induites par le NO. ....	59
<b>Figure 17:</b> réaction de Tyrosine-nitration.....	60
<b>Figure 18 :</b> réaction de S-nitrosylation.....	61
<b>Figure 19:</b> Résumé schématique des principaux mécanismes post-traductionnels régulés par S-nitrosylation.....	62
<b>Tableau 4:</b> représentation de quelques protéines S-nitrosylées et leurs fonctions cellulaires. ....	63
<b>Figure 20:</b> (a) Mécanismes de denitrosylation par la thiorédoxine (TRX) et la S-nitrosoglutathione réductase (GSNOR). (b) autre mécanisme de dénitosylation médié par la thiorédoxine.....	64
<b>Figure 21:</b> cascade enzymatique d'ubiquitination.....	68
<b>Figure 22:</b> structure schématique de l'ubiquitine et des différentes chaînes engendrées ainsi que leur implication en physiologie animale.....	69
<b>Figure 24:</b> ubiquitination de TRAF6 de façon dépendante et indépendante d'Ubc13. ....	73
<b>Figure 25:</b> les protéines de la famille Rel/ NF $\kappa$ B et leurs inhibiteurs naturels I $\kappa$ B chez le mammifère.....	75
<b>Figure 26:</b> les principales voies de signalisation de NF $\kappa$ B.....	77
<b>Figure 27 :</b> Différentes étapes de la technique du « Biotine Switch Assay » (BSA). ....	129

<b>Figure 28 :</b> Analyse en spectrométrie de masse en tandem nLC MS/MS réalisé en collaboration avec la plateforme de protéomique Clipp de l'IFR100 à Dijon. ....	129
<b>Tableau 5.</b> Liste des protéines S-nitrosylées par la combinaison lipide A/IFN $\gamma$ dans les cellules cancéreuses mammaires EMT-6H. ....	131
<b>Figure 29 :</b> Détermination du site de S-nitrosylation de la protéine UBC13. ....	132
<b>Figure 30:</b> Ubiquitination d'Ubc13. ....	134
<b>Figure 31 :</b> L'activité d'ubiquitination d'Ubc13 est inhibée par la S-nitrosylation. ....	135
<b>Figure 32 :</b> Analyse de l'activité cytotoxique du NO. ....	137
<b>Figure 33 :</b> Principe du « Biotin Switch Assay » ....	140



# CHAPITRE I : Introduction

## I. Le cancer du sein

### 1. Epidémiologie

En 2010 en France métropolitaine, le nombre de nouveaux diagnostics de cancer (incidence) chez l'homme a été estimé à 203 100, contre 154 600 chez les femmes, soit une augmentation d'incidence de 5400 cas par rapport à 2009. En 2010, le cancer du sein est le plus fréquent chez la femme, avant le cancer colorectal et le cancer du poumon avec respectivement 48 500, 18 900 et 10 000 nouveaux cas par an. Le cancer du sein se situe en tête de la mortalité par cancer, avec plus de 11 800 décès en 2010, même si le taux de mortalité diminue en France depuis près de 15 ans (Institut National de la Veille Sanitaire). Cette maladie est aujourd'hui considérée comme un véritable problème de santé publique qui touche particulièrement les pays développés (Figure 1). Néanmoins, il existe une inégalité dans le dépistage et la déclaration de la pathologie entre pays développé et pays en développement expliquant cette disparité géographique.



**Figure 1:** Disparité géographique mondiale des taux d'incidence du cancer du sein chez la femme en 2011.

*Les taux d'incidence sont donnés pour 100 000 femmes. (Source : (Abrous-Anane et al. 2011))*

## 2. Dépistage

Le cancer du sein est une pathologie qui évolue lentement puisque l'apparition d'une tumeur de 1 cm<sup>3</sup> peut prendre une dizaine d'année. C'est pourquoi, en France, une campagne de dépistage intensif des cancers du sein chez les femmes de 50 ans et plus a été mise en place depuis 2004, d'après l'institut national du cancer. D'après Cochin et al (2008), cette campagne de dépistage par mammographie a contribué à diminuer d'environ 7% la mortalité due au cancer du sein chez la femme âgée de plus de 50 ans, grâce à un diagnostic et une prise en charge plus précoce (Cochin et al. 2008). Ce dépistage organisé ne touche qu'une partie de la population, les femmes âgées de plus de 50 ans, mais il peut également être individuel chez des patientes présentant des facteurs de risques.

## 3. Facteurs de risques

Il s'agit le plus souvent de facteurs de risques familiaux, avec l'existence d'un cancer du sein chez un parent du premier degré (mère, sœur, enfant), des risques individuels (puberté précoce, ménopause tardive, première grossesse après 40 ans) ou génétiques (mutation des gènes p53, BRCA1 ou 2, surexpression de Her2/neu2) (tableau 1) (Mc Pherson et al. 2000). Le diagnostic repose sur une analyse anatomopathologique à partir d'une biopsie.

Facteur	Risque relatif	Groupe à haut risque
Age	>10	>40 ans
Pays d'origine	5	Pays développés
Régime alimentaire	1,5	Excès de graisses saturées
Consommation d'alcool	1,3	Consommation excessive
Age des premières règles	3	<11 ans
Age à la ménopause	2	>54 ans
Age de la première grossesse à terme	3	>40 ans
Traitements hormonaux	1,3	Usage prolongé
Antécédent de maladie bénigne	4-5	Hyperplasie atypique

**Tableau 1:** Principaux facteurs de risques de cancer du sein. *Source McPherson et al (McPherson et al. 2000).*

#### **4. Inflammation et cancer du sein**

Une réponse inflammatoire, qui dans des conditions normales est nécessaire à induire une réaction immunitaire, peut cependant être un des mécanismes de carcinogenèse. C'est Virchow (1863) qui est le premier à postuler que le cancer prend son origine aux sites d'inflammation chronique. Une constatation en partie basée sur l'hypothèse que plusieurs produits chimiques induisant de l'inflammation augmentent la prolifération cellulaire (David 1988). Cette corrélation inflammation/cancérisation est renforcée par le fait que l'utilisation prolongée de faibles doses d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens, tels que l'aspirine, exercent un effet protecteur contre plusieurs types de cancer y compris le cancer mammaire. En effet, l'aspirine est décrite pour interférer dans la production d'oestrogènes de l'organisme et inhibe la synthèse de prostaglandines. Les prostaglandines sont elles-mêmes connues pour être des initiatrices indirectes de la synthèse d'oestrogènes. C'est cette diminution qui aurait un effet protecteur (DuBois et al., 2004). Il est maintenant admis que si des mutations sporadiques ou héréditaires de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la différenciation et de l'adhésion représentent des événements précoces dans la carcinogenèse ('initiation'), l'inflammation chronique amène de nouveaux éléments qui complètent cette transformation ('promotion'). Cette inflammation est induite par des cellules du système immunitaires telles que les macrophages infiltrant les tumeurs (TAM = tumor-associated macrophages), les mastocytes, les neutrophiles, etc (Vendramini-Costa et al., 2012). Ces différentes cellules produisent une variété de médiateurs tels que les radicaux libres oxygénés (ROS), et des espèces nitrosantes qui peuvent induire des cassures de l'ADN, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le  $\text{TNF}\alpha$ , l' $\text{IFN}\gamma$ , l'IL-1, -6, et -8 ou de facteur tel que le VEGF, qui, grâce à leur potentiel prolifératif, augmentent le nombre de cellules à haut risque de mutations. En effet, cette combinaison de dommages à l'ADN et signaux prolifératifs crée un environnement favorable au développement du cancer (Vendramini-Costa et al., 2012). Alors que le microenvironnement tumoral peut également créer un environnement défavorable à la tumorigénèse, via la libération de facteurs anti-inflammatoire ou antiprolifératif tel que l'IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  (Taylor et al., 2010). Ainsi, le plus souvent, le phénotype inflammatoire s'accompagne par la libération d'autres facteurs solubles ayant des rôles pro ou anti-inflammatoire.

### *Facteur pro-inflammatoire dans la tumorigénèse: exemple du VEGF*

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est essentielle au cours de la tumorigénèse pour pallier au manque nutritionnel et en oxygène due au développement et à la croissance de la tumeur (Harris et al., 2002). La sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou les membres de la famille des récepteurs au VEGF vont permettre une meilleure irrigation de la tumeur ainsi qu'une meilleure dissémination des cellules tumorales pour induire des métastases (Crawford and Ferrara, 2009). En effet, les cellules endothéliales vont être activées par des facteurs pro-angiogéniques (VEGF) issu du microenvironnement tumoral (Berger and Benjamin, 2003).

### *Facteur anti-inflammatoire dans la tumorigénèse: exemple du TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor- $\beta$ )*

Le TGF- $\beta$  est une cytokine pléiotropique connue pour agir au niveau de toutes les phases du développement de la glande mammaire (Taylor et al, 2010;. Moïse et Barcellos-Hoff, 2011). En effet, le TGF- $\beta$  agit comme un puissant suppresseur de tumeur dans les cellules épithéliales mammaires normales, mais subit une transformation fonctionnelle spectaculaire au cours de la tumorigénèse mammaire. Le TGF- $\beta$  acquiert alors une fonction de promoteur de tumeur qui induit l'invasion de la matrice extracellulaire et la formation de métastases, via notamment l'activation de l'angiogénèse (Taylor et al ., 2010; Tian et al, 2011).

## **5. Les différents types de cancers du sein**

La classification des cancers du sein fut dans un premier temps basée sur l'aspect morphologique de la tumeur par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1981.

Les avancées techniques ont ensuite permis à l'OMS, en 2003, de réviser cette classification et d'y ajouter plusieurs critères :

1. le stade de la tumeur
2. le statut histologique
3. le grade de différenciation
4. l'expression de gènes ou de protéines au niveau de la tumeur

La classification TNM de l'Union International Contre le Cancer (UICC) permet de distinguer les pathologies suivant leurs extensions cliniques et histopathologiques et de définir le stade d'un cancer de 0 à IV suivant sa malignité. Cette classification rend compte de plusieurs paramètres dont la taille de la tumeur primaire (T), l'envahissement des ganglions lymphatiques (N) et la présence de métastases (M) éloignées du foyer primaire (tableau 2) (Espié and Gorins, 2001).

Lettre	Signification	Description
<b>T</b>	Tumeur	Taille de la tumeur <a href="#">primitive</a> et degré de propagation dans les tissus voisins (envahissement local)
<b>N</b>	Ganglions lymphatiques	Propagation du cancer aux ganglions lymphatiques voisins, taille des ganglions atteints et nombre de ganglions atteints
<b>M</b>	Métastases	Propagation du cancer vers des organes éloignés (métastases)

**Tableau 2 : La classification TNM.**

### ***Tumeur primitive (T)***

TX	Impossible d'évaluer la tumeur primitive
T0	Aucun signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i>
T1, T2, T3 ou T4	Nombre correspondant à la taille de la tumeur et à l'étendue de la propagation. Plus le nombre est élevé, plus la tumeur est grosse et plus le cancer s'est propagé aux structures et aux tissus voisins.

### ***Ganglions lymphatiques régionaux (N)***

NX	Impossible d'évaluer les ganglions lymphatiques régionaux
N0	Aucun signe d'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux
N1, N2 ou N3	Nombre correspondant au degré de propagation du cancer dans les ganglions lymphatiques régionaux

### ***Métastases à distance (M)***

M0	Aucun signe de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance

L'ensemble de ces paramètres va contribuer à l'établissement du pronostic et permettre de personnaliser le traitement à chaque patient.

## **6. Classification anatomo-clinique des cancers du sein (pour revue, Espié et Gorins, 2001)**

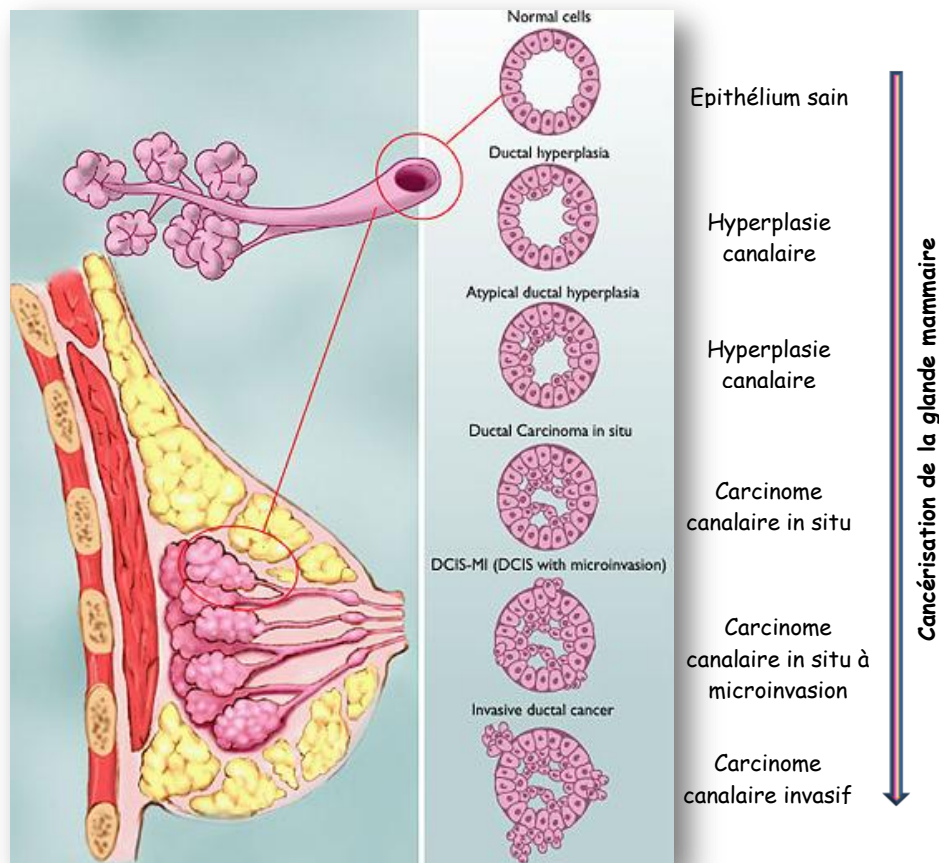
On distingue d'abord le carcinome *in situ* où la lame base demeure intègre et les cellules cancéreuses prolifèrent dans la lumière de la glande, contrairement au carcinome infiltrant où la lame basale a perdu sa fonction de barrière entraînant une migration des cellules cancéreuses au niveau des tissus sous-jacents.

### **6.1 Carcinome *in situ***

La prolifération du tissu cancéreux se développe dans la lumière des canaux et des lobules, mais ne franchit pas la lame basale et peut ainsi envahir le tissu conjonctif. On distingue le carcinome **canalaire *in situ*** (intracanalair) caractérisé par une prolifération épithéliale maligne dans la lumière du canal galactophore et le carcinome **lobulaire *in situ*** (intralobulaire) où la prolifération épithéliale de cellules monomorphes se fait dans les alvéoles des lobules.

### **6.2 Carcinome infiltrant**

Le carcinome infiltrant se caractérise par un envahissement des cellules tumorales au niveau du tissu conjonctif et pouvant donner des métastases. Le carcinome canalaire infiltrant, dont l'établissement suit plusieurs étapes (figure 2), représente la forme la plus fréquente des tumeurs malignes du sein (75%) avec un pronostic mauvais et des métastases ganglionnaires et osseuses fréquentes. Le carcinome lobulaire infiltrant est le second plus fréquent type de cancer infiltrant du sein, il représente 8 % des cancers infiltrants et est souvent difficilement identifiable à la mammographie. Le carcinome canalaire *in situ* peut conduire au carcinome lobulaire infiltrant.



**Figure 2 :** Cancérisation de la glande mammaire : exemple du carcinome canalaire.

*Les cellules épithéliales prolifèrent de façon anarchique sous l'effet de divers signaux (facteurs de croissance par exemple) pour atteindre le stade d'hyperplasie canalaire. Dans un second temps, les cellules se différencient et acquièrent de nouvelles propriétés phénotypiques (dont la migration) et peuvent passer la membrane basale pour envahir les tissus avoisinants et former des métastases. Source : <http://www.bccancer.bc.ca/default.htm>*

## 7. Les traitements

Le traitement du cancer du sein dépend du type et du stade de la maladie, de l'âge et de l'état de pré ou post-ménopause.

### 7.1 La chirurgie (chirurgie mammaire, curage ganglionnaire axillaire)

La chirurgie est le traitement standard du cancer du sein. Elle reste le moyen le plus efficace pour guérir cette affection lorsqu'elle est diagnostiquée à un stade précoce (Howard and Bland 2012). Le type de chirurgie se fera en fonction du diagnostic histologique et du stade d'évolution : carcinome canalaire, lobulaire infiltrant ou carcinome in situ. On pratique



aujourd'hui soit la tumorectomie, soit la mastectomie associée au curage ganglionnaire axillaire. Le curage ganglionnaire consiste en l'exérèse de la chaîne ganglionnaire lymphatique proximale. Toutefois, ce traitement est rarement suffisant à lui seul et doit souvent être complété par des traitements adjuvants locaux tels que la radiothérapie, ou systémiques tels que la chimiothérapie ou l'hormonothérapie (Dean 2008).

## **7.2 La radiothérapie**

La radiothérapie occupe une place importante dans le traitement du cancer du sein. C'est une technique médicale dite loco-régionale qui utilise les rayonnements ionisants pour détruire des cellules tumorales ou tissus cancéreux. Son objectif est de délivrer de la manière la plus précise possible une dose de rayonnements adaptée au volume de la tumeur, en épargnant au mieux les tissus sains avoisinants. Elle s'applique de manière externe ou interne grâce à la curiethérapie (Howard and Bland 2012). Cette technique est utilisée, après mastectomie pour réduire le risque de rechutes chez les patientes ou pour diminuer la taille d'une tumeur afin de proposer une chirurgie conservatrice. Néanmoins cette thérapie entraîne des effets secondaires tels que des brûlures (Dean 2008).

## **7.3 La chimiothérapie**

La chimiothérapie a pour objectif d'empêcher la prolifération anarchique des cellules cancéreuses, en agissant à des niveaux stratégiques tels que le cycle cellulaire ou la prolifération. Ainsi de nombreuses molécules chimiques ont émergé en tant que médicament chimiothérapeutique et en fonction du stade et du grade de la tumeur vont être utilisées en mono ou polychimiothérapies.

Ces substances chimiques se répartissent en plusieurs familles, dont les anthracyclines (inhibent l'activité topo-isomérase), les agents alkylants (empêchent la duplication de l'ADN), les alcaloïdes (déstabilisent le fuseau mitotique), les anti-métabolites (inhibent la synthèse d'acides nucléiques) et les taxanes (empêchent la division cellulaire) (tableau 3) (Mignot and Morvan 1996). Bien que cette stratégie ait pour but de cibler les cellules cancéreuses, elle cible également les cellules saines en prolifération qui garantissent l'homéostasie, ce qui est à l'origine de nombreux effets secondaires indésirables (diarrhées, vomissement, alopecie, desquamation, anémie, neutropénie).

Agent	Nom Commercial en France	Taux de réponse (%)
5-FU	5-Fluoro-Uracile	23
Méthotrexate	Ledertrexate®	30
Doxorubicine	Adriblastine®	35
Cyclophosphamide	Endoxan®	34
Melphalan	Alkéran®	21
Vinorelbine	Navelbine®	35
Vincristine	Oncovin®	20
Docétaxel	Taxotère®	<b>50</b>

**Tableau 3 :** Principaux agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement des cancers du sein. Source Mignot et Morvan (Mignot and Morvan 1996). *Le taux de réponse correspond à la survie post-clinique et est personne dépendante.*

#### 7.4 L'hormonothérapie (anti-oestrogènes, progestatifs, agonistes de la LH-RH)

Dans près de 75% des cas, le cancer est classé dans la catégorie hormono-dépendant, le traitement de choix est alors l'hormonothérapie. Il s'agit d'une thérapie ciblée qui consiste à bloquer l'action d'hormones telles que l'œstradiol en empêchant son activité physiologique grâce à l'utilisation d'antagoniste, ou via l'inhibition de sa synthèse (Martinez Guisado et al. 2011). Une des premières utilisations de cette thérapie consistait en une ovariectomie pratiquée chez des femmes pré-ménopausées atteintes de cancer du sein. L'objectif étant d'empêcher l'activation des récepteurs hormonaux surexprimés à la surface des cellules

tumorales par les œstrogènes. L'inhibiteur compétitif le plus fréquemment utilisé est l'anti-œstrogène commercialisé sous le nom de Tamoxifène.

Il est indiqué en traitement adjuvant de première intention chez la femme non ménopausée. L'utilisation d'inhibiteur de l'aromatase, enzyme impliqué dans la synthèse d'œstrogènes à partir des androgènes, a également été développée. Ainsi il a été *montré in vitro* une inhibition de la prolifération de cellules tumorales dépendantes d'œstrogènes et *in vivo* une régression tumorale dans de nombreux modèles de cancers hormono-dépendants. Lorsque le cancer atteint le stade de métastases, on préconise l'utilisation de progestatifs ou d'agonistes de la LH-RH qui inhibent la synthèse d'œstrogènes par l'ovaire (ménopause artificielle). Cependant l'efficacité de ces traitements est limitée à l'apparition de résistances dans quasiment tous les cas de cancer hormono-dépendant mais également à l'apparition de nombreux effets secondaires.

### **7.5 Immunothérapie par les anticorps monoclonaux**

Le développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes tumoraux constitue une avancée thérapeutique majeure dans l'immunothérapie des cancers chez l'homme. Ces anticorps peuvent inhiber la croissance tumorale par une action directe sur les cellules, via le recrutement de cellules immunitaires effectrices cytotoxiques vis-à-vis de la tumeur ou par une lyse via le complément. L'utilisation d'anticorps monoclonaux chimériques ou humanisés dans le traitement du cancer du sein représente aujourd'hui une thérapie de choix (Weiner et al. 2009). En effet, chez près de 25% des patientes on observe une surexpression du récepteur Her-2/Neu qui fait partie de la famille des récepteurs de l'EGF. Lorsqu'une patiente surexprime Her-2 avec un score de 3+ (+++) en immunohistochimie, on préconise un traitement par l'Herceptine (Trastuzumab), un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la protéine oncogénique Her-2/Neu (c-Erb-b2) (Dillman 2011). Quand la tumeur atteint un stade métastatique, on cible le facteur de croissance vasculaire endothélial, VEGF par un anticorps monoclonal anti-VEGF, l'Avastin (Bevacizumab). Ainsi, le VEGF ne peut plus interagir avec son récepteur et par conséquent bloque l'angiogenèse tumorale, inhibe la croissance tumorale et empêche la progression métastatique. Malgré les rechutes, cette stratégie permet d'améliorer la qualité de vie des patients en leur évitant de nombreux effets secondaires dus aux chimiothérapies de référence (Haba-Rodriguez Jde et al. 2013).

## **7.6 Les limites des traitements et besoins d'innovations**

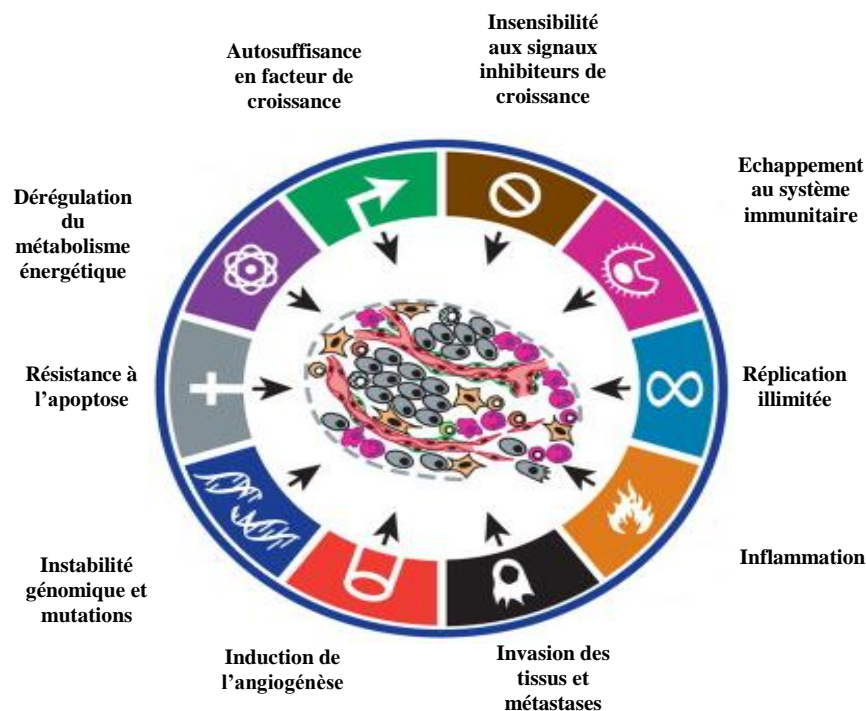
Les limites des traitements actuels, associés aux effets secondaires parfois lourds, stimulent les réflexions concernant des thérapies ciblées, pour traiter le cancer du sein. En effet, chaque cancer semble unique et avoir ses propres caractéristiques biochimiques et cliniques. Une grande partie des patientes ne répondent pas aux traitements actuellement proposés ou y répondent de façon insuffisante, ce qui freine le pronostic et le choix thérapeutique. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques que la recherche scientifique pourrait mettre à disposition de la médecine.

## **II. Immunothérapie anti-tumorale et lipide A**

### **1. L'immunothérapie anti-tumorale**

L'idée que la prolifération anormale des cellules cancéreuses puisse être contrôlée par le système immunitaire n'est pas un concept nouveau puisqu'elle a initialement été suggérée par Paul Ehrlich en 1909. Mais comme la connaissance du système immunitaire et de son fonctionnement étaient mal connus à l'époque cette hypothèse fut rejetée. Plus tard dans les années 1950, Frank M. Burnet et Lewis Thomas ont introduit le concept d'immunosurveillance des cancers. Ils proposent qu'une des fonctions physiologiques du système immunitaire soit de reconnaître et détruire tout matériel étranger à l'organisme. Ce système immunitaire comprend deux lignes de défense de l'organisme : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Les principales cellules du système immunitaire inné sont le polynucléaire neutrophile, le macrophage, la cellule dendritique (DC) et la cellule natural killer (NK), les plaquettes (Steinman and Witmer 1978) (Smith and Kang 2013). Ces cellules sont capables de phagocyter et lyser des organismes étrangers (cellules cancéreuses, bactéries, virus, d'autres pathogènes) via la sécrétion de molécules solubles (granzyme B, perforine, chimiokines, cytokines). La reconnaissance de ces organismes se fait par la liaison de molécules conservées dans l'évolution appelées motifs moléculaires associés aux organismes pathogènes (PAMP, Pathogen-Associated Molecular Pattern) avec des récepteurs spécifiques appelés récepteurs de reconnaissance des formes (SDRP) ou encore PRR (Pattern Recognition Receptor) dont le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) fait partie. Les cellules tumorales ne produisent pas de PAMP, et sont donc en mesure d'échapper à la surveillance immunitaire (Hanahan and Weinberg 2011). A l'origine, la cellule cancéreuse est issue d'une cellule du « soi » qui a subi une modification

de son génome de façon spontanée ou induite par différents agents (virus oncogènes, agents physiques ou chimiques). Ces lésions du génome entraînent des modifications irréversibles qui se transmettent aux cellules filles qui se différencient alors des cellules du « soi ». En effet la cellule tumorale développe alors de nouvelles fonctions, une synthèse protéique différente et exprime de nouveaux antigènes que le système immunitaire peut alors repérer. Ainsi, d'après Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg (2011), la cellule tumorale est capable d'autosuffisance en facteurs de croissance, d'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance, d'une instabilité génomique, d'échappement au système immunitaire, d'inflammation, de résistance aux mécanismes d'apoptose, d'une capacité répliquative illimitée, d'une faculté à favoriser l'angiogénèse, de déréguler le métabolisme énergétique et enfin est capable d'envahir les tissus et à générer des métastases (Figure 3) (Hanahan and Weinberg 2011).



**Figure 3:** caractéristiques de la cellule tumorale ou « Hallmarks of cancer ». (D'après Hanahan et al, 2011).

Un des rôles de l'immunité adaptative qui apparaît secondairement à l'immunité innée est une reconnaissance spécifique des antigènes. En effet, après phagocytose du pathogène, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) activent le système immunitaire adaptatif en lui présentant les antigènes via les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) dans le but d'activer cette seconde ligne de défense spécifique.

Les principales cellules effectrices de l'immunité adaptative sont les lymphocytes B qui produisent des anticorps spécifiques à un antigène et les lymphocytes T.

Le rôle de système immunitaire dans le contrôle de la prolifération tumorale est assez bien argumenté. En effet, l'équipe de Schreiber R a montré que des souris déficientes pour le gène RAG (Recombinaison Activating Gene) codant pour le réarrangement des immunoglobulines et du récepteur T, développent beaucoup plus de tumeurs de façon spontanée et chimio-induite en comparaison à des souris sauvages (Shankaran et al. 2001). Une étude montre que le déficit en cellules de l'immunité innée (NK) ou adaptative (LT CD4) chez des souris augmente la fréquence des tumeurs, ce qui tend à compléter l'argument de l'importance d'un système immunitaire intègre dans la croissance tumorale, par exemple (Bui and Schreiber 2007).

Malgré la coopération étroite entre le système immunitaire inné et adaptatif et la diversité des moyens de lutte développés par l'organisme, il arrive que ces cellules cancéreuses échappent à la surveillance du système immunitaire et se développent sous forme de tumeur. Une stimulation efficace du système immunitaire pourrait alors être une solution thérapeutique qui permettrait la reconnaissance des antigènes tumoraux et le rejet des cellules tumorales. Plusieurs essais cliniques de phase I ont été développés pour tester cette idée, comme par exemple le transfert adoptif de cellules T-mémoires issues de la moelle osseuse de patientes atteintes de cancer de sein métastatique réactivées ex-vivo. Cette stratégie a permis l'augmentation de la survie de certaines de ces patientes (médiane de survie 58.6 vs. 13.6 mois;  $p = 0.009$ ) (Domschke et al. 2013).

## **2. L'immunothérapie par les LPS**

### **2.1 Historique**

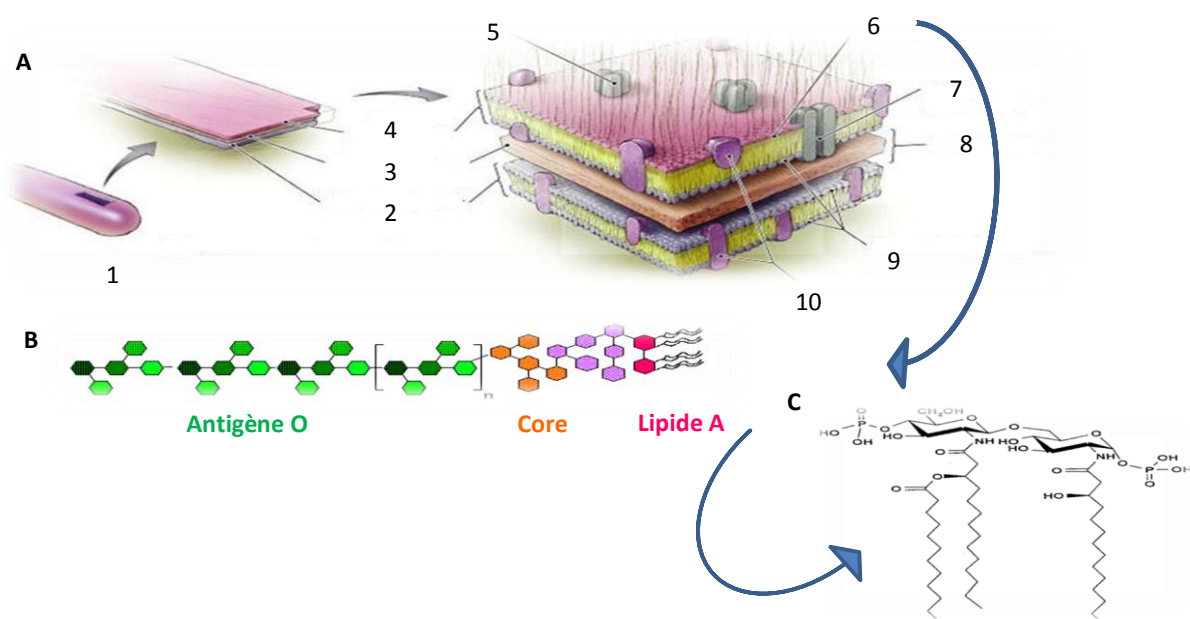
Dès les années 1700, Deidier remarque un lien étroit entre thérapie anti-cancéreuse et infection par les bactéries (Deidier, 1725). Mais l'un des pionniers de l'immunothérapie par les toxines bactériennes reste le chirurgien du *Memorial Hospital* de New York, William Coley qui à la fin du siècle dernier avait observé la régression d'un sarcome chez un patient après surinfection avec un streptocoque pathogène. Par la suite, il traita de nombreux patients avec un mélange de toxines bactériennes « Coley's toxin » et rapporta une belle régression tumorale (Coley 1898). Ce n'est qu'en 1943 que Shear et Turner montrent que l'effet antitumoral de la toxine de Coley était dû aux endotoxines.

Her HW développe, 100 ans après les travaux de Coley, une immunothérapie par administration intra-vésicale du Bacille de Calmette-Guerin (BCG) après exérèse chirurgicale de patients atteints de cancers superficiels de la vessie (Herr et al. 1988). Ce traitement montre une efficacité significative et réduit de façon considérable le risque de récurrence (Tillou et al. 2008). Au cours de la même décennie, l'équipe de Galanos montre que l'activité biologique des LPS (lipopolysaccharides) est due au Lipide A (Galanos et al. 1984).

## 2.2 Traitement par un analogue de lipide A : l'OM-174

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des constituants de la membrane externe des bactéries à Gram négatif tel qu'*E.Coli*. Les LPS sont décrits pour être responsables de la toxicité des bactéries. Ils ont une structure qui se compose en trois parties : une chaîne latérale (ou antigène O) composé d'un polymère d'unités oligosaccharidiques responsable des propriétés antigéniques spécifiques d'une souche bactérienne, un core central oligosaccharidique et une **partie lipidique invariable** (lipide A) responsable du pouvoir toxique de l'espèce bactérienne et de son activité anti-tumorale (figure 4).

Dans notre équipe, différentes structures de lipides A ont été étudiées quant à leurs activités antitumorales *in vivo* (Jeannin et al. 1991) et une activité antitumorale optimale a été obtenue avec l'un d'eux : l'OM-174. Ainsi, nous utilisons ce lipide A qui a été obtenu par extraction d'une souche mutante d'*Escherichia coli* puis purifié par chromatographie. L'OM-174 est donc un analogue de lipide A chimiquement caractérisé comme étant le 2-deoxy-6-O-[2-deoxy-2- [(R)-3-dodecanoyloxytetra-decanoylamino]-4-O-phospho-β-D-glucopyranosyl]-2-[(R)-3-hydroxy-tetradecanoylamino]-α-D-glycopyranosyl dihydrogenphosphate.



**Figure 4:** Architecture des LPS et structure chimique de l'analogue de lipide A OM-174. **(A)** Les LPS sont les constituants de la membrane externe des bactéries à Gram négative comme *Escherichia coli* (1 : bactérie à Gram négative, 2 : membrane cellulaire, 3 : peptidoglycane, 4 : membrane externe, 5 : porine, 6 : Lipopolysaccharide, 7 : porine, 8 : espace périplasmique, 9 : bicouche de phospholipides, 10 : protéines). **(B)** Les LPS ont une structure partagée en 3 régions : une chaîne O-spécifique composée d'un polymère d'unités oligosaccharidiques, responsable des propriétés antigéniques, une région centrale oligosaccharidique et la partie lipidique la plus stable, le lipide A. **(C)** structure de l'analogue de lipide 1, OM-174. Source : [www.studyblue.com](http://www.studyblue.com).

L'activité anti-tumorale de l'OM-174 (OM Pharma, Genève) a été étudiée dans un modèle de cancer colique chez le rat. Les cellules cancéreuses coliques PROb injectées par voie intra-péritonéale à des rats BDIX syngéniques induisent des carcinomatoses péritonéales à tous les animaux. Sans traitement tous les rats meurent de leurs tumeurs en 6 à 7 semaines. Un traitement par l'OM-174 guérit 90 à 100 % des rats porteurs de carcinomatoses (Onier et al. 1999). L'activité anti-tumorale de l'OM-174 a également été montrée dans un modèle de mélanome. Les cellules de mélanome B16 injectées par voie sous-cutanée à des souris C57BL/6 induisent la formation de tumeurs, dont la croissance est retardée par l'injection intraveineuse d'OM-174 (Gautier et al. 2010).

La voie de signalisation de l'OM-174 n'est pas connue mais comme tous les lipides A, elle pourrait impliquer la voie du CD14. Le CD14 est une protéine couplée aux LBP (LPS



Binding Protein) (Delude et al. 1995). Dans la littérature, il est décrit que le CD14 ne possédant pas de domaines TIR (Toll IL1 Receptor) intracellulaire, doit interagir avec la protéine Toll Like Recepteurs 4 (Watson and Riblet 1974) pour induire une signalisation. Le CD14 pourrait ainsi assurer le transfert du lipide A de la LBP au TLR4, mais il n'existe aucune donnée à ce jour sur le transfert du lipide A *in vivo*. TLR4 reconnaît le lipide A mais également d'autres ligands tels que le taxol (Kawasaki et al. 2000), l'acide hyaluronique (Taylor et al. 2004), quelques protéines de choc thermiques (HSP 60 et HSP 70) (Ohashi et al. 2000).

#### *Rôle des facteurs solubles CD14 et MD2 dans la signalisation du lipide A*

Le CD14 est une protéine liée à la membrane cellulaire par le GPI (glycosylphosphatidylinositol) peut initier la transduction du signal du lipide A (Wright et al. 1990). Le CD14 même en absence de LBP est capable de lier le lipide A. CD14 existe sous forme soluble et peut fixer le lipide A sur des cellules qui sont déficientes en CD14 membranaire. En effet, la fixation du lipide A sur le CD14 induit la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B ainsi que la synthèse de cytokine telle que l'Il-6 (Libermann and Baltimore 1990). Cette signalisation induit également l'expression de la NOS II et de l'Il-1b dans les macrophages péritonéaux et les monocytes circulants de rats (Takai et al. 1997). CD14 ne possède pas de domaine transmembranaire nécessaire à la transduction du signal. Le complexe LPS-LBP-CD14 requiert donc un récepteur supplémentaire pour transduire ce signal. Il s'agit essentiellement de la protéine transmembranaire TLR4.

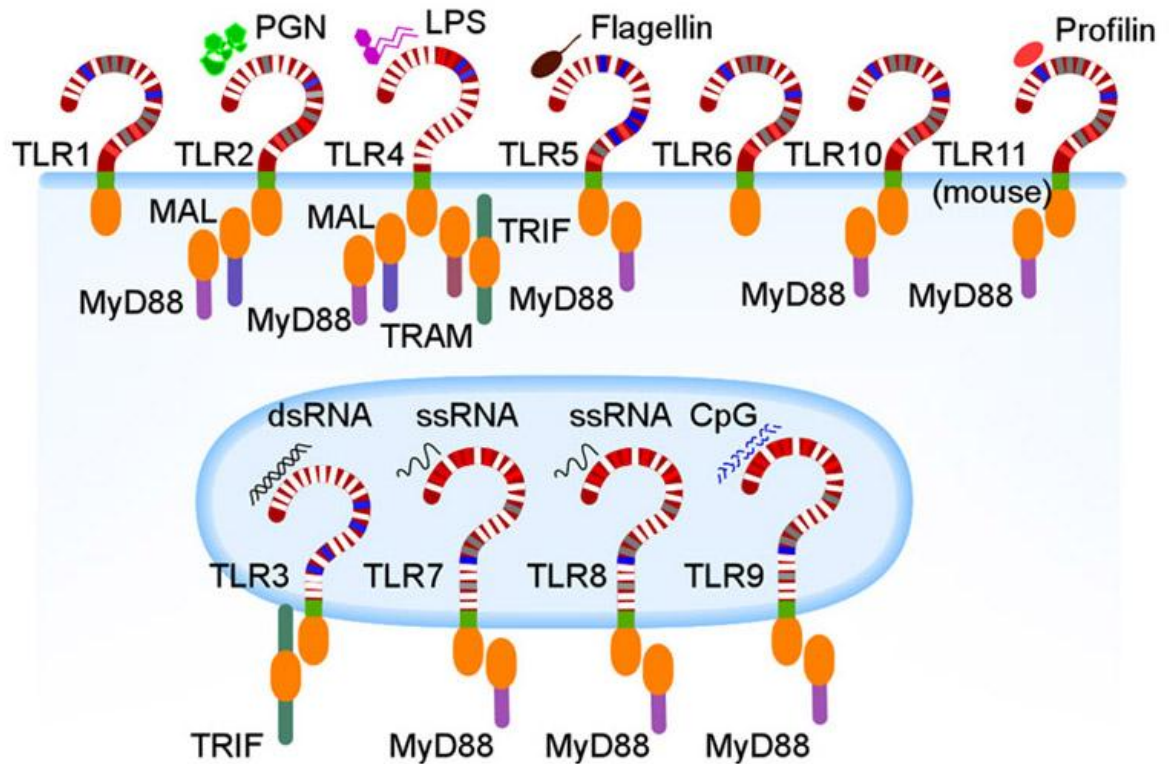
L'association de la protéine MD2 au domaine extracellulaire de TLR4 est requise pour une activation optimale (Taylor et al. 2007). MD2 est principalement retrouvée sous forme soluble et un domaine intra-membranaire a été décrit, mais sa fonction est mal connue. Le lipide A est transféré au complexe TLR4-MD2 par le CD14 et interagit avec les 3 composants de ce complexe. Il semblerait que MD2 soit impliqué dans la reconnaissance du lipide A (Jiang et al. 2000) (Akashi et al. 2001).

### **3. Signalisation du lipide A**

#### **3.1 TLRs et immunothérapie anti-tumorale**

La découverte de la protéine Toll, dans les années 1980, chez *Drosophila melanogaster*, a permis de caractériser son rôle dans le développement embryonnaire et plus

particulièrement dans l'orientation de la polarité dorso-ventrale (Hashimoto et al. 1988). Ce n'est que quelques années plus tard que la protéine Toll a été identifiée comme étant un récepteur pouvant initier une réponse immunitaire vis-à-vis d'un pathogène (Lemaitre et al. 1996). En effet, une des principales caractéristiques de la réponse immunitaire de la drosophile consiste en la synthèse d'un cocktail de puissants peptides antimicrobiens en réponse à une infection. L'analyse génétique de la régulation de l'expression des gènes codant pour ces peptides a mené à l'identification de la voie Toll. Cette voie semble être activée en réponse à des infections par des champignons ou des bactéries à Gram positif (Hoffmann 2003). La mise en évidence du rôle de Toll dans la réponse antifongique de la drosophile est à l'origine de la recherche de récepteurs homologues chez le règne mammifère. C'est ainsi qu'une famille de récepteurs apparentés à Toll, les Toll-like récepteurs, a été identifiée chez ces derniers (Medzhitov et al. 1997; Rock et al. 1998). On en dénombre actuellement 13 membres (TLR1 à 13) chez la souris dont 10 sont formellement identifiés chez l'homme (TLR1 à 10) (Chaudhary et al. 1998; Takeuchi et al. 1999; Du et al. 2000; Chuang and Ulevitch 2001) (figure 5).



**Figure 5:** les TLRs et leurs ligands. *Source : (Akira et al. 2006).*

Les TLRs sont donc des récepteurs de l'immunité innée, appartenant à la famille des PRRs (Pattern-Recognition Receptors). Ils interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée par reconnaissance de motifs moléculaires conservés chez les pathogènes : les PAMPs. La reconnaissance de ces récepteurs par leurs ligands active plusieurs cascades de signalisation qui aboutissent à la mise en place des effecteurs de l'immunité innée. En plus de fournir une première ligne de défense contre les pathogènes, l'immunité innée joue un rôle instructif vis-à-vis de l'immunité acquise. Il a également été montré que l'activation de ces récepteurs peut induire la production de chimiokines (cytokines), augmenter l'expression des molécules de costimulation et jouer un rôle primordial dans l'orientation des réponses immunitaires vers un profil Th1. Ce nouveau concept est renforcé par un récent travail qui montre l'induction d'un effet immunogène des cellules tumorales par une variété de chimiothérapie (Apetho et al., 2007). Ce travail décrit une nouvelle voie de présentation d'antigènes par les cellules cancéreuses impliquant HMGB1 (une protéine sécrétée par des cellules mortes en réponse à une chimiothérapie) et TLR4 exprimé par les cellules dendritiques. Dans ce modèle, l'activation de TLR4 induit l'activation des cellules T et une réponse immunitaire antitumorale. En accord avec ces résultats, il a été montré que des

patients qui expriment un TLR4 muté avec une perte de fonction, présentent un taux de survie plus court que des patients sans mutation, confirmant le rôle majeur de la réponse immunitaire antitumorale lors de traitements par des chimiothérapies. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré le rôle que peuvent jouer les ligands des TLRs en tant qu'adjuvants dans l'immunothérapie anti-tumorale (van Duin et al. 2006). Dans ce contexte, les TLRs pourraient par conséquent constituer une approche thérapeutique intéressante dans le traitement des cancers, en particulier si ces cellules tumorales expriment certains de ces récepteurs et sont sensibles à leurs agonistes.

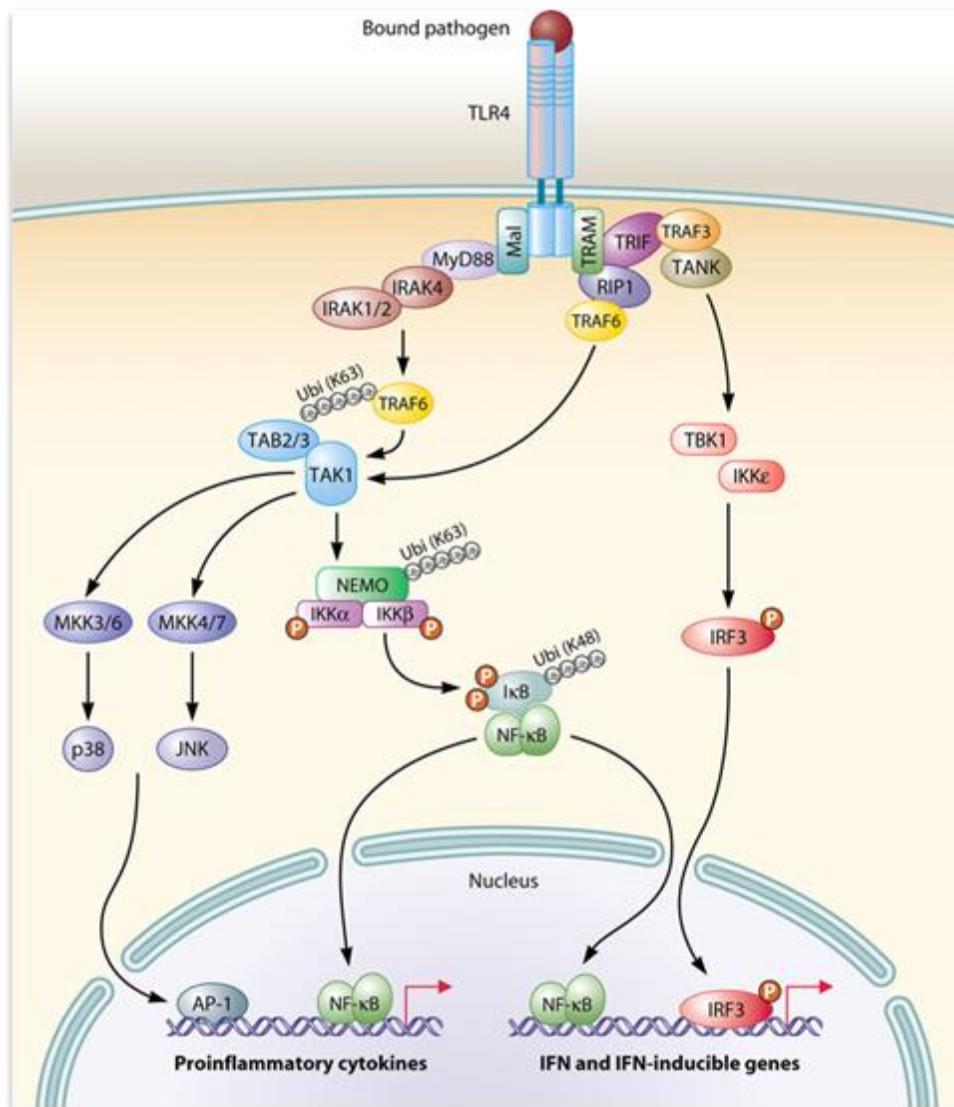
### **3.2 Voie de signalisation du TLR4**

La voie de signalisation intracellulaire des TLR est proche de celle des récepteurs à l'IL-1. Tous les TLR contiennent un domaine intracellulaire de signalisation nommé TIR (toll IL-1 receptor). Ce dernier transmet en aval des signaux via le recrutement d'une ou plusieurs protéines adaptatrices contenant un domaine TIR, telle que la protéine MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88), TIRAP (TIR domain containing adaptator protein), TRIF (TIR domain containing adaptator protein inducing IFN- $\beta$ ), TRAM (TRIF related adaptator molecule), les protéines de la famille IRAK.

La signalisation des TLRs est décrite pour suivre deux voies: la voie dite MyD88-dépendante et la voie MyD88-indépendante (figure 6).

La voie MyD88-indépendante ou TRIF-dépendante aboutit plus tardivement à l'expression de cytokines pro-inflammatoires et à l'expression d'IFN- $\beta$  en activant IRF-3. Cette dernière voie de signalisation peut activer d'une manière tardive les voies de NF- $\kappa$ B et des MAPK.

La voie MyD88-dépendante permet le recrutement de différentes protéines telles que IRAK-1,-4 (IL1R associated kinase), et TRAF6 (TNFR associated factor 6), conduisant à l'activation de la voie des MAP kinases (p38, JNK1/2 et ERK1/2), entraînant la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (p50/p65), l'activation de AP-1 (c-Fos/c-Jun) et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, et de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, ainsi que des médiateurs lipidiques, métabolites de l'acide arachidonique tels que les prostaglandines, les thromboxanes, les leucotriènes ou le platelet-activating factor (PAF-1).



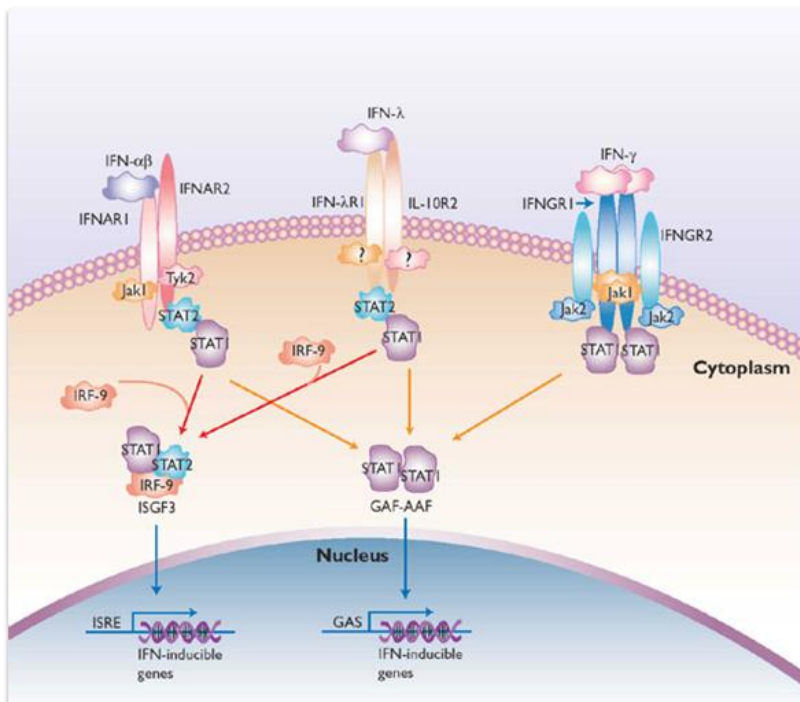
**Figure 6:** Les voies de signalisation de TLR4. Il existe deux voies de signalisation : la voie Myd88 dépendante et la voie Myd88 indépendante. TLR4 active à la fois les voies MyD88-dépendantes et MyD88-indépendante. La voie MyD88-dépendante est responsable de la phase précoce de NF-κB et l'activation de MAPK, qui contrôlent l'induction de cytokines pro-inflammatoires. La voie MyD88 indépendante, active IRF3, qui est nécessaire pour l'induction de l'IFN-β et des gènes inducibles de l'IFN. De plus, cette voie module la phase tardive NF-κB ainsi que l'activation des MAPK, contribuant à la production de cytokines pro-inflammatoires. Source : (Mogensen 2009)

Il a récemment été décrit que l'activation du TLR4 des cellules tumorales induirait l'expression de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, notamment la production d'IFNγ qui inhibe la croissance tumorale (Andreani et al. 2007), mais également l'expression la NOS II.

### 3.3 Production d'interféron-gamma (IFN $\gamma$ ) et ses récepteurs

Les interférons (IFNs) sont des cytokines essentielles pour le contrôle de l'infection et la réponse immunitaire et manifestent une ou des fonctions suppressives de tumeur (Xie et al. 1993). Le nom d'interféron provient de leur capacité à avoir une interférence anti-virale dans les cellules, on sait qu'ils fournissent une protection et sont une barrière naturelle contre les infections causées par des virus externes, des bactéries, des mitogènes et des cellules tumorales (Weiner et al. 2009). Les IFNs ont trois activités biologiques principales : une activité antivirale, une activité anti tumorale et une activité immunorégulatrice. Pour obtenir un effet antiviral, d'autres protéines doivent être produites, les protéines effectrices, qui vont être capables de déclencher un mécanisme antiviral ou antiprolifératif. Le fait que dans certaines conditions, quelques IFNs peuvent bloquer les cellules à une étape donnée du cycle cellulaire, en ont fait un terrain d'étude de choix dans la recherche anti tumorale.

Il existe deux types d'IFNs humains. Le type I inclut les IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\epsilon$  et  $\kappa$  (Honda et al. 2006). Les IFNs humains de type II consistent en un seul gène codant pour l'IFN $\gamma$  (ou interféron immun) ayant un récepteur différent des IFNs de type I. Ce récepteur est composé de deux sous unités, IFNGR1 et IFNGR2 (Figure 7).



**Figure 7:** Représentation schématique des récepteurs aux interférons (IFN) de types I et II. Les récepteurs des IFNs appartiennent à la famille de récepteurs aux cytokines de classe II. Les IFN de type I se lient à leur récepteur sous forme de monomère. Le récepteur est un dimère composé de deux chaînes, IFNAR1 et IFNAR2C. L'IFN de type II se lie à son récepteur sous forme de dimère. Le récepteur est composé de quatre chaînes, deux chaînes IFNGR1 et deux chaînes IFNGR2. source : (Vilcek 2003).

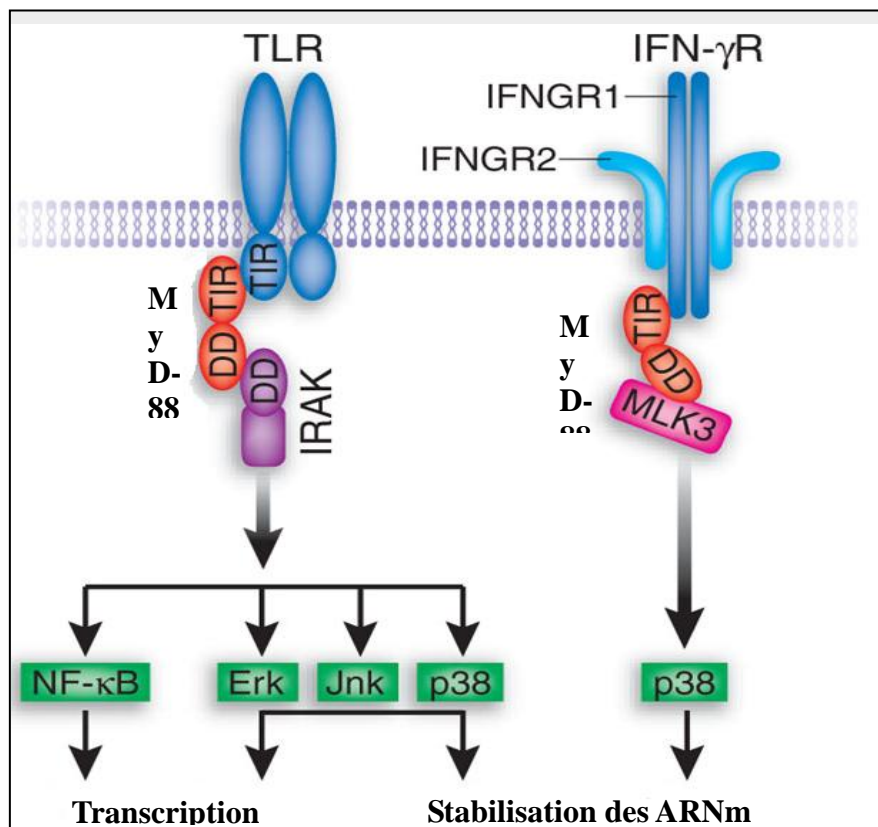
L'IFN $\gamma$  est instable à pH acide, caractéristique importante pour les thérapies car il est souvent utilisé en combinaison avec un acide (tel que l'acide rétinoïque) pour inhiber la croissance tumorale (Pelicano et al., 1998). Les IFNs qui sont de type I et de type II ont émergé en tant que coordinateurs centraux des interactions du système immunitaire et tumoral ; particulièrement, l'IFN $\gamma$  qui a un rôle pivot dans la promotion des réponses anti-tumorales (Dunn et al. 2006). De plus, la découverte de patients humains très sensibles aux infections mycobactériennes rares, avec des déficiences dans la production d'IFN $\gamma$  et dans leur signalisation montre clairement l'importance de l'IFN $\gamma$  dans la résistance aux infections microbiennes (Jouanguy et al. 1996; Jouanguy et al. 1999). Néanmoins, des données montrent que l'IFN $\gamma$  aurait un rôle protecteur contre le développement d'une tumeur (Ikeda et al. 2002). L'activité antitumorale de ce dernier a été confirmée dans plusieurs modèles de tumorigénèse primaire (Enzler et al. 2003) (Kaplan et al. 1998; Street et al. 2002); l'IFN $\gamma$  participe donc à un processus d'élimination du cancer qui protège les souris contre des tumeurs chimio-induites, spontanées et transplantables. L'IFN $\gamma$  a une action différente de celle de l'IFN $\alpha$ : il augmente l'activation des cellules T en synergie, c'est-à-dire en combinaison avec notamment l'IL2. Pour ce qui est des macrophages, l'IFN $\gamma$  peut augmenter la production du CMH de classe II en plus d'augmenter la quantité de CMH de classe I sur les cellules tumorales (Jonasch and Haluska 2001). Les thérapies anti-tumorales à base d'IFN $\gamma$  ont été introduites au milieu des années 1980, mais les résultats ne sont pas complètement concluants. Cependant, dans ces études, l'IFN $\gamma$  est toujours utilisé en combinaison avec d'autres traitements, comme la chimiothérapie, et semble actif contre certains types de cancers, comme les leucémies myéloïdes chroniques et les lymphomes folliculaires. Pour les autres cancers, les effets secondaires induits par l'IFN $\gamma$  chez les patients sont toujours plus sévères et des études approfondies doivent se faire. En effet, son mécanisme d'action sur les cellules tumorales est seulement partiellement compris. Bien que de nombreuses études montrent que l'IFN $\gamma$  a un potentiel considérable dans le traitement des infections non virales, telles que les maladies parasitaires, son application clinique n'a pas encore été testée. En dépit de son rôle anti tumoral dans des modèles animaux, l'IFN $\gamma$  rencontre un succès limité dans des essais cliniques humains, explicable par les facteurs suivants : l'insensibilité de la cellule tumorale à l'IFN $\gamma$ , l'incapacité à délivrer localement l'IFN $\gamma$  (due à l'expression ubiquitaire de son récepteur) ou une incapacité thérapeutique à recapituler la périodicité naturelle de la production de l'IFN $\gamma$ . Des travaux sont en cours pour évaluer le potentiel clinique des



vecteurs exprimant l'IFN $\gamma$ , de nouvelles formes d'IFNs et de nouveaux modes d'administration des IFNs (Dunn et al. 2005) (Ni et al. 2013) (Fluhr et al. 2013).

#### 4. Interaction IFN $\gamma$ et TLR

La signalisation en réponse à l'IFN $\gamma$  a été beaucoup étudiée à travers la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transductor and Activator of Transduction) (Platanias 2005). Un dialogue a été établi entre TLR4 et IFN $\gamma$  par le fait qu'une stimulation avec de l'IFN $\gamma$  déclenchait une association physique entre l'IFN $\gamma$ R1 et MyD88, et entraînait l'activation de la MAPK p38 (Sun and Ding 2006). De plus, MyD88 semble augmenter la stabilité de certains ARNm pro-inflammatoires induits par l'IFN $\gamma$  (TNF et IP10). La stabilité de certains ARNm est régulée par la MAPK p38 (Frevel et al. 2003). D'autres chercheurs ont observé que l'expression de MyD88 était augmentée dans des cellules plasmatiques humaines par une exposition à l'IFN $\gamma$  (Liu et al. 2007). MyD88 serait donc un élément commun à la voie des TLR et celle de l'IFN $\gamma$  (figure 8).



**Figure 8:** Représentation schématique de l'interaction entre la signalisation des TLR et de l'IFN $\gamma$  : importance de la molécule MyD-88. Source : (Han 2006)



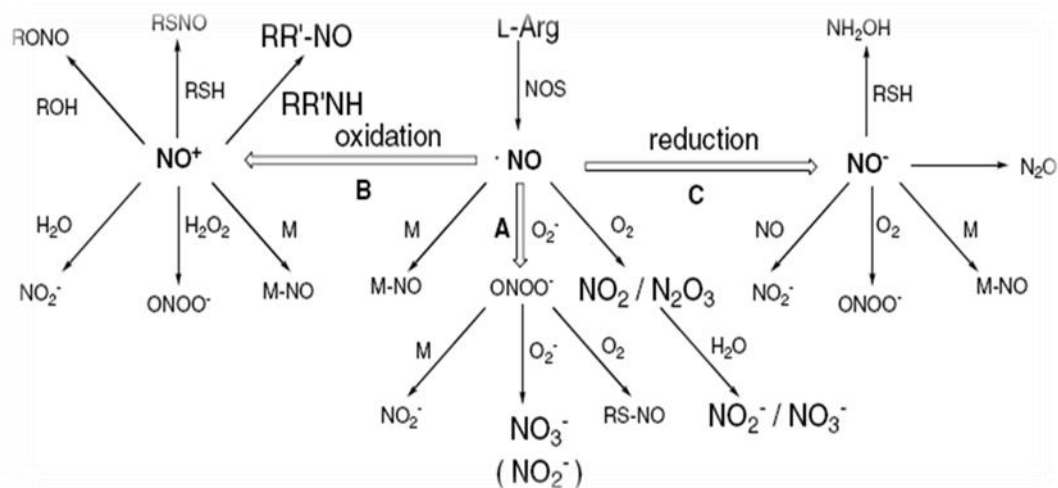
Une des fonctions les plus importantes de l'IFN $\gamma$  est de sensibiliser les macrophages à une activation par des produits pathogènes. En fait, l'IFN $\gamma$  fut d'abord nommé « facteur activant les macrophages » (Schroder et al. 2006). De nombreuses études ont démontré l'existence d'une synergie entre les voies de signalisation induites par l'IFN $\gamma$  et les LPS conduisant à la production de NO par des macrophages murins (Lorsbach et al. 1993; Gao et al. 1997). La synergie entre l'IFN $\gamma$  et les agonistes de TLR pour la production de NO peut être une conséquence d'une coopération des facteurs de transcription induits par l'IFN $\gamma$  (comme STAT1) et induits par les TLR (comme NF $\kappa$ B) au niveau du promoteur de la NOS II, mais aussi par d'autres mécanismes, comme l'induction de l'arginosuccinate synthétase et la GTP-cyclohydroxylase I (Schroder et al. 2004), l'augmentation de la régulation du transporteur de l'arginine CAT2 (Kakuda et al. 1999), mais aussi une augmentation de la régulation des TLR de surface. En effet, l'expression des TLR eux-mêmes peut être régulée par l'IFN $\gamma$ . Les ARNm de TLR2, TLR4, et TLR6 sont induits par une stimulation avec de l'IFN $\gamma$ , augmentant ainsi l'expression à la surface des protéines TLR2 et TLR4 dans des monocytes et macrophages humains (Mita et al. 2001; Bosisio et al. 2002; Tamai et al. 2003). Yamada et al, 2005, ont montré que l'IFN $\gamma$  augmentait l'expression de TLR4 dans des cellules cancéreuses de vessie humaine RT4 (Yamada et al. 2005). Dans cet article, ils montrent que les LPS et IFN $\gamma$  seuls activent d'une manière limitée NF $\kappa$ B et pas AP1, alors que la combinaison des deux augmente significativement NF $\kappa$ B et AP1.

L'IFN $\gamma$  active aussi la signalisation des TLR en régulant l'expression des molécules accessoires et des adaptateurs de cette signalisation. Plusieurs études dans des cellules humaines (macrophages monocyte et cellules épithéliales) montrent une induction de CD14, de MD2 ainsi que MyD88 et IRAK1 en réponse à l'IFN $\gamma$  et LPS (Adib-Conquy and Cavaillon 2002; Bosisio et al. 2002; Suzuki et al. 2003; Tamai et al. 2003; Mochizuki et al. 2004). L'IFN $\gamma$  est connu pour réguler de façon positive l'expression de monoxyde d'azote synthase inductible.

### III. Le monoxyde d'azote (NO)

#### 1. Généralité sur le NO

Initialement connu sous le nom d'EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), le monoxyde d'azote (NO) est une espèce radicalaire libre, incolore, inodore et très réactive. Dans les conditions normales de pression et de température, le NO se présente sous forme d'un gaz diatomique ubiquitaire impliqué dans de nombreuses réactions biochimiques chez toutes les espèces vivantes. Sous sa forme radicalaire, il possède un électron non apparié sur son orbitale non liante 2p-pi responsable de sa forte réactivité. En effet, le gain d'un électron engendre l'anion nitroxyle ( $\text{NO}^-$ ) et la perte de l'électron non apparié forme le cation nitrosium ( $\text{NO}^+$ ). Ces différents états d'oxydo-réduction lui permettent d'agir comme un faible oxydant ou comme un réducteur (Stamler et al. 1992; Hanafy et al. 2001) (Figure 9).



**Figure 9 :** les réactions de réduction et d'oxydation du NO. *Source : (Hanafy et al. 2001)*

Le NO est également produit par la combustion des carburants, il a été élu « molécule de l'année 1992 » par le magazine Science, suite à la découverte de son large éventail de fonctions biologiques (relaxation du muscle lisse, inhibition de l'agrégation plaquettaire et la neurotransmission). Six ans plus tard, Furchgott, Ignarro et Murad se partagent le prix Nobel de médecine et de physiologie pour leurs découvertes majeures sur le NO (Furchgott 1998). Les nombreuses études autour de cette molécule ont pu montrer qu'à température et pression atmosphérique normales, le NO était un gaz relativement stable en milieu aqueux et agirait

comme un messager dans de nombreux processus physiologiques. Les formes inorganiques telles les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) ont longtemps été considérés comme des résidus du métabolisme du NO endogène mais elles sont également recyclées dans le sang et les tissus pour former du NO. Ces espèces constituent donc une réserve pour pallier une production enzymatique insuffisante de NO (Boje and Lakhman 2000).

## **2. Production de NO**

### **2.1 Les donneurs de NO**

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses recherches concernant les fonctions biologiques du NO et des espèces réactives dérivées du NO, ont permis de développer des donneurs de NO utilisés en pharmacologie. Ces donneurs de NO se divisent en plusieurs familles, suivant la voie biochimique permettant la formation du NO. De manière générale, il existe trois principales voies de libération du NO par les donneurs de NO.

La décomposition chimique ou thermique de la molécule donneuse de NO permet la libération du NO (Utepbergenov et al. 1995). C'est le cas, par exemple, des composés de type S-nitrosothiols ( $\text{RSNO}$ ) ou des diazeniumdiolates (composés contenant des unités structurales de type  $\text{X}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ ) (Stubauer et al. 1999; Carver et al. 2005).

La libération du NO à partir des nitrates organiques requiert leur bioactivation par des enzymes telles que la glutathion-S-transférase, le cytochrome P450 ou l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). C'est le cas, par exemple, du glycéryltrinitrate (GTN ou trinitrine ou nitroglycérine) qui est métabolisé par l'ALDH (Chen et al. 2002).

Le NO peut être largué dans le milieu cellulaire suite à des réactions chimiques qui peuvent se produire avec des acides, des alcalis, du métal ou des thiols. En effet, les groupes thiols présents dans le cytoplasme participent au métabolisme non enzymatique des nitrates organiques. De façon théorique, tous les thiols sont capables de décomposer les nitrates organiques en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ). Mais ce n'est pas toujours le cas en physiologie car seul un nombre limité de cystéines sont accessibles et par conséquent peuvent réagir avec ces composés pour libérer du NO. C'est le cas des nitrites, les syndnonimines et autres nitrates organiques (Abrams 1991; Boesgaard 1995).

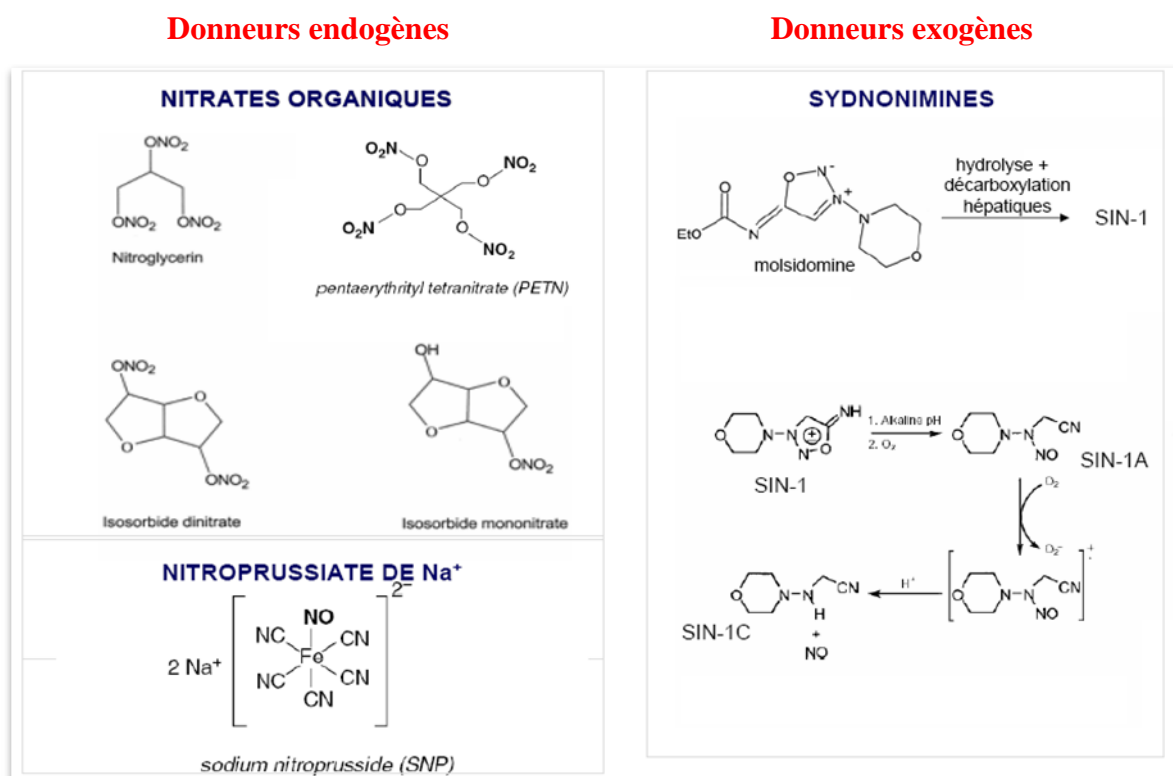
#### *Donneurs exogènes*

On distingue les donneurs de NO exogènes, dont la libération du NO se fait de façon spontanée. Ces molécules contiennent un ou plusieurs groupes NO qui se détachent de la

molécule porteuse en milieu aqueux. Il s'agit par exemple de la molsidomine, et du nitroprusside de sodium (SNP : Sodium NitroPrusside) (figure 10), qui sont actuellement utilisés en clinique dans le traitement des cancers gastrique (Yang et al. 2013). La molsidomine est métabolisée dans le foie en un dérivé instable qui libère du NO et le SNP se décompose dans les tissus en un dérivé thiocyanate et en NO.

### Donneurs endogènes

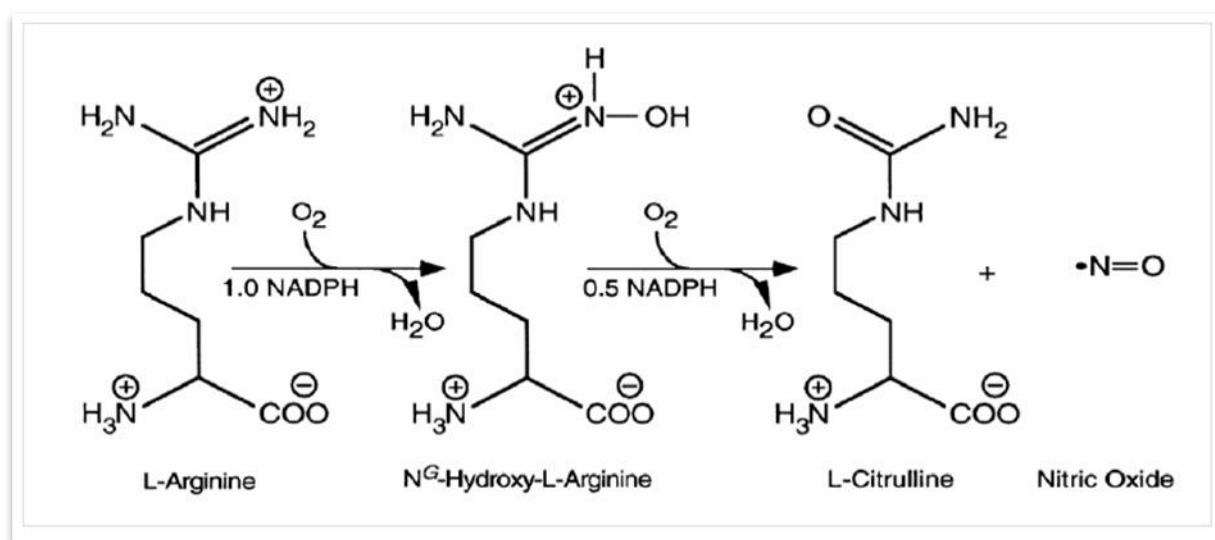
On distingue les donneurs de NO endogènes, dont la libération du NO nécessite l'intervention de partenaires cellulaires. Ils comprennent les dérivés nitrés, des composés du type HO-ONO<sub>2</sub>. On peut donner l'exemple de molécules déjà utilisées en clinique telles que le GTN, le tétranitrate d'érythrityle, ou encore le tétranitrate de penta-érythrityle ou dinitrate d'isosorbide (ISDN : IsoSorbide DiNitrate) (figure 10). La libération du NO à partir de ces dernières molécules nécessite la présence de cofacteurs dans le milieu intra- ou extracellulaire. De nombreuses voies semblent impliquées *in vivo* dans la formation de NO à partir des dérivés nitrés, mais le mécanisme métabolique reste à être défini.



**Figure 10:** donneurs de NO endogènes et exogènes.

## 2.2 Origine cellulaire du NO : les monoxydes d'azote synthase

Physiologiquement, la production endogène de NO est catalysée par un groupe d'isoenzymes que sont les monoxydes d'azote synthases (NOS) : la NOS neuronale (nNOS) ou NOS I et la NOS endothéliale (eNOS) ou NOS III qui sont des formes constitutives, et une forme inducible (iNOS) ou NOS II (Knowles and Moncada 1994). Les NOS sont des monooxygénases  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes. Elles transforment la L-arginine en hydroxyarginine puis réduisent l'hydroxyarginine en monoxyde d'azote plus citrulline (Figure 11).

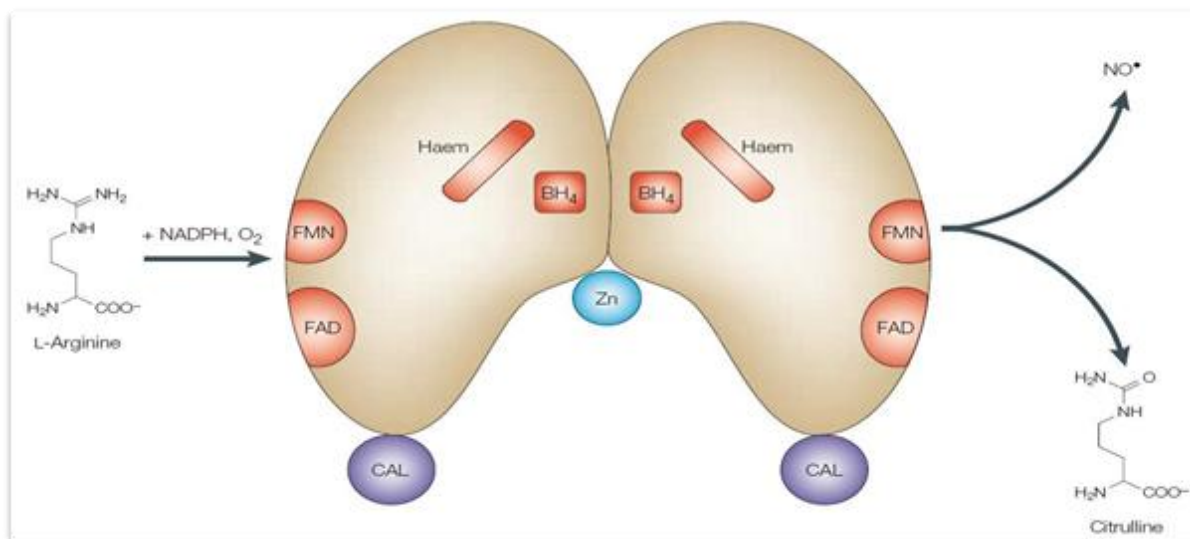


**Figure 11:** schéma réactionnel de la production de NO à partir de L-arginine par les NOS (Vallance and Leiper 2002)

Identifié en 1989, ce groupe d'isoenzymes a été cloné et purifié au début des années 1990 par Bult et al (Bult et al. 1990). Les NOS, comme leur nom l'indique diffèrent par leur localisation cellulaire, présentent des régulations et des propriétés catalytiques diverses, ainsi qu'une homologie de séquence d'environ 55%. Ces enzymes sont essentiellement régulées par des modifications post-traductionnelles, par leurs localisations spécifiques au niveau cellulaire, par la biodisponibilité des substrats et des cofacteurs enzymatiques (Li and Poulos 2005). Elles peuvent également être impliquées dans la formation de complexes protéiques, régulant ainsi leur activité catalytique (Kone et al. 2003).

La quantité de NO produite diffère selon l'isoforme. En effet, les NOS I et III sont exprimées dans les tissus de façon constitutive et permettent de maintenir un taux basal assez faible de NO (de l'ordre de la nanomole). Leur activité est dépendante de la concentration intracellulaire en calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et est régulée par la calmoduline (CaM). Au contraire, l'expression de la NOS II est induite dans des conditions pathologiques et inflammatoires. Par exemple, elle est induite dans les cas d'infections parasitaires, virales et bactériennes ou en réponse au microenvironnement cytokinique ( $\text{IL-1}\beta$  et 2,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ) (Lima-Junior et al. 2012) (Heitmeier et al. 1997). La NOS II est connue pour être activée dès sa synthèse. En effet, cette activité de la NOS II est indépendante de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  puisqu'elle est liée à la CaM, et ne nécessite donc pas d'apport calcique. Elle produit des fortes concentrations en NO, environ 1000 fois supérieures à celles produites par les NOS constitutives (de l'ordre de la micromole) sur une période prolongée pouvant atteindre quelques jours. Les trois NOS sont apparentées à la famille des cytochromes P450 et codées par trois gènes distincts, respectivement sur les chromosomes 12, 17 et 7, chez l'homme.

L'activité des NOSs nécessite la présence de substrats ( $\text{O}_2$  et L-arginine) et de cofacteurs enzymatique tels que la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate réduit (NADPH), la tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ), la flavine adénine dinucléotide (FAD), et la flavine adénine mononucléotide (FMN). Pour être activées, les NOS doivent être sous forme d'homodimères. Chaque monomère possède une structure en deux domaines, un domaine réductase et un domaine oxygénase. La partie C-terminale agit comme domaine réductase et contient les sites de liaison pour la FAD, la FMN et le NADPH. La partie N-terminale agit quant à elle comme domaine oxygénase et contient les sites de liaison à l'hème, au  $\text{BH}_4$  et à la L-arginine (Sennequier and Stuehr 1996). Lorsqu'une NOS se trouve sous forme de dimère et que les différents cofacteurs sont réunis, le domaine réductase d'un monomère peut transférer les électrons de la NADPH vers le FAD puis vers la FMN pour finir sur l'hème du domaine oxygénase de l'autre monomère. Ensuite en présence de  $\text{BH}_4$  et d'oxygène, l'enzyme catalyse la conversion de la L-arginine en N-hydroxy-L-arginine puis L-citrulline et la libération simultanée de NO (figure 12).



**Figure 12:** schéma de la formation de l'hétérodimère de la NOS II (Vallance and Leiper 2002)

De nombreuses études s'intéressent aux rôles du NO produit par des différentes NOS dans la régulation de la pathogénèse.

#### *Les NOS constitutives*

La NOS I est exprimée de façon constitutive dans les neurones, les muscles squelettiques et l'épithélium pulmonaire (Minc-Golomb and Schwartz 1994; Toda et al. 2009). Le NO produit joue alors un rôle de neurotransmetteur (Belvisi et al. 1991; Toda and Okamura 1992).

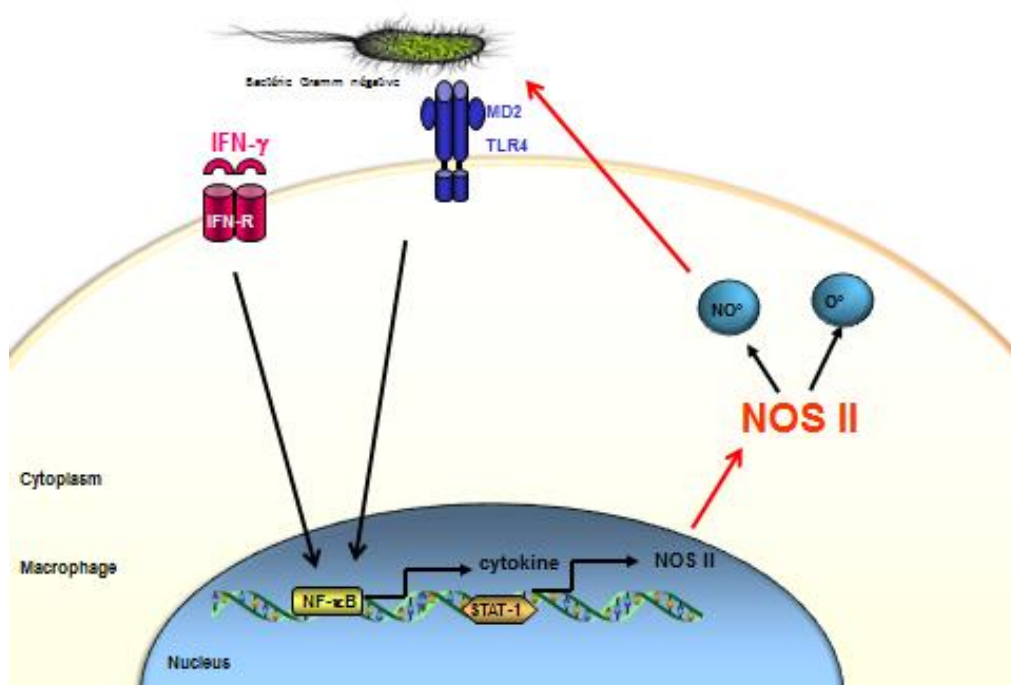
La NOS III est exprimée de façon constitutive dans les cellules épithéliales, les cardiomyocytes, ou encore dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Dinerman et al. 1994; Hammoud et al. 2007). Le gène codant son expression est situé sur le chromosome 7. A l'état basal, elle est liée à la membrane plasmique et est typiquement associée aux cavéoles (Feron et al. 1996). L'interaction de la NOS-3 avec la cavéoline est décrite pour empêcher la fixation de la CaM au complexe et par voie de conséquence d'inhiber la production de NO. La NOS III est régulée par différents stimuli tels que la bradykinine, l'acétylcholine, le VEGF, ou encore l'histamine. Ces stimuli engendrent la libération de Ca<sup>2+</sup> par le réticulum endoplasmique. Ainsi, le Ca<sup>2+</sup> s'associe à la CaM pour séparer la NOS III de la cavéoline grâce à la protéine de choc thermique Hsp90 (Heat shock protein 90). Cette dissociation

engendre l'activation de la NO III. Après une stimulation prolongée, le complexe ainsi formé se dissocie et l'enzyme est recyclée en étant relocalisée au niveau de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique.

### *La NOS inducible*

Etant donnée l'implication de la NOS II dans ce travail de thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à la régulation de cette enzyme.

La NOS II a pour la première fois été isolée à partir de macrophages murins puis dans des cellules tumorales d'origines diverses : prostate, poumon, sein, colon (Duenas-Gonzalez et al. 1997; Aaltoma et al. 2001; Tong et al. 2007). Le gène codant son expression est situé sur le chromosome 17. Cette isoforme n'est pas exprimée dans les cellules quiescentes, mais est rapidement induite en réponse à différents stimuli. La synthèse de la NOS II est induite par le LPS, l'IFN $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$  et est inhibée par des cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF $\beta$  et l'IL-10. Cette stimulation des cellules, entraîne une augmentation de la transcription du gène codant pour la NOS II, et la production de NO (figure 13).



**Figure 13:** induction de la NOS II dans le macrophage murin après stimulation par l'IFN $\gamma$  et les LPS. La co-stimulation du récepteur au lipide A, TLR4 et du récepteur à l'IFN-g induit l'expression de la NOS II des macrophages murins.



La régulation de l'expression de la NOS II se fait au niveau transcriptionnel mais également après sa transcription via sa stabilité, sa dimérisation ou sa phosphorylation. Les voies de signalisation NF- $\kappa$ B, MAPK et JAK/STAT sont les principales voies de régulation de son expression (Kleinert et al. 2004) .

### **2.3 Les différents niveaux de régulation de la NOS II**

L'expression de la NOS II est régulée différemment en fonction de l'espèce : dans des cellules de rat ou de souris, elle est induite par le LPS, l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et d'autres composés. En revanche, la majorité des cellules humaines requiert une combinaison de cytokines complexes incluant l'IFN $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$  pour l'induction de la NOS II (Kleinert et al. 2003). Des macrophages bovins et murins génèrent des quantités considérables de NOS II en réponse à des cytokines, alors que des macrophages humains et de cochon sont résistants (Jungi et al. 1996). Les voies JAK/STAT et NF $\kappa$ B sont les principales voies de régulation de l'expression de la NOS II. D'ailleurs, une déficience phénotypique de l'expression de la NOS II résulte de l'altération de chacun des trois gènes suivants : ceux qui codent pour l'IFN $\gamma$  (Dalton et al. 1993), pour une chaîne du récepteur à l'IFN $\gamma$  (Huang et al. 1993) et pour IRF-1 (interferon regulatory factor-1) (Kamijo et al. 1994). Dans la plupart des études *in vitro*, seulement une combinaison de plusieurs cytokines est nécessaire pour initier une profonde expression génique de la NOS II, alors qu'un simple stimulus présente un effet modéré dans des types cellulaires spécifiques. Cela suggère qu'une ou plusieurs voies de signalisation sont nécessaires pour induire pleinement l'expression de la NOS II.

#### *Régulation transcriptionnelle de la NOS II*

Généralement, ni les cellules immunitaires ni les cellules tumorales non stimulées n'expriment l'ARNm et la protéine NOS II. Les cytokines provoquent l'accumulation de l'ARNm et de l'enzyme NOS II mais également l'accumulation de nitrites et nitrates dans le milieu de culture (Forrester et al. 1996). Les gènes et promoteurs humains et murins sont très longs et différents. L'expression du gène de la NOS II murine est régulée par un promoteur de 1,7 kb constitué de deux régions bien décrites. Les sites de liaison aux facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, NF-IL6, IRF et Oct-1 régulent l'activité promotrice du gène de la NOS II. Ils comportent de nombreux sites potentiels de liaison de facteurs de transcription. Les promoteurs d'une espèce sont inefficaces dans l'autre ce qui suggère des facteurs de transcription ou de combinaison de facteurs de transcription spécifiques. Alors que les

facteurs de transcriptions impliqués dans la transcription du gène humain de la NOS II sont essentiellement NF- $\kappa$ B, AP-1, p53 (qui réprime l'activité du gène) et ESE-1 de la famille Ets-1 (Rudders et al. 2001), chez la souris, ce sont NF- $\kappa$ B, IRF-1 et GAS (Lowenstein et al. 1994). Il a été montré au laboratoire le rôle des facteurs de transcription tel qu'OCT-1 (Goldring et al. 1996; Reveneau et al. 2012) ainsi que l'implication du site de liaison du facteur de choc thermique HSF-1 (Heat Shock Factor-1) et du facteur USF (Upstream Stimulatory Factor) (Goldring et al. 2000).

### *Régulation de l'activité de la NOS II par phosphorylation*

L'activité de la NOS II peut être régulée par phosphorylation, cependant très peu de choses sont connues sur la régulation post-traductionnelle de la NOS II. En effet, la littérature montre que l'activité de cette enzyme semble plutôt régulée au niveau transcriptionnel et via sa localisation cellulaire. Il a été proposé que la phosphorylation sur des résidus tyrosine par la tyrosine kinase src puisse affecter la localisation et la fonction de la NOS II (Hausel et al. 2006). La phosphorylation par la kinase ERK sur la sérine 745 a également été décrite (Zhang et al. 2007). L'utilisation d'inhibiteurs de phosphatase augmente l'activité de la NOS II dans un modèle de cellules glomérulaires mésangiales de souris (MES-13) après stimulation par une combinaison LPS/ IFN $\gamma$  (Lin et al. 2008). Cependant, les données actuelles ne permettent pas de définir clairement un rôle activateur ou inhibiteur de la phosphorylation de la NOS II, contrairement à ce qui est observé avec la phosphorylation de la NOS neuronale qui maintient l'enzyme dans une conformation permettant sa dimérisation et donc une production de NO en continue (Okada 1998).

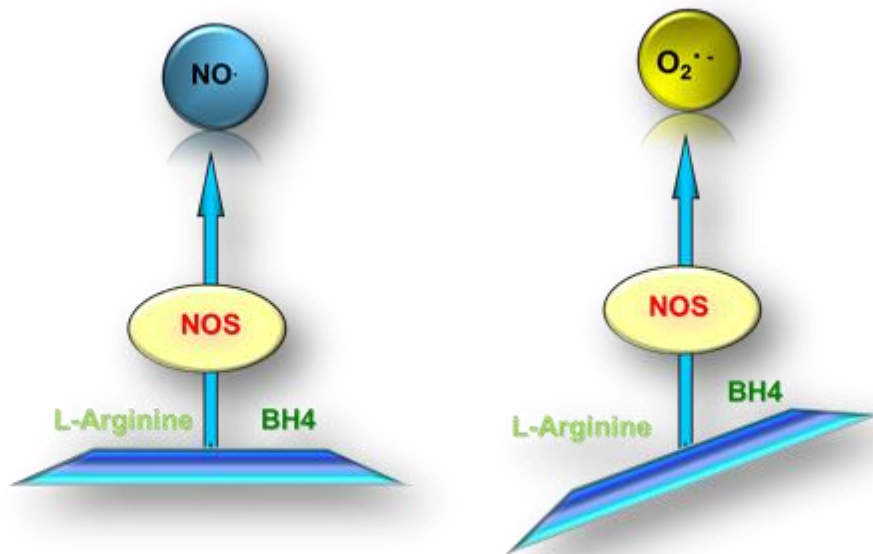
### *Inhibition de l'activité enzymatique par compétition ou allostérie*

Il y a un nombre très important de publications concernant les inhibiteurs des NOS et leurs potentielles applications en pharmacologie. Il faut distinguer les inhibiteurs non sélectifs qui bloquent les trois NOS et les sélectifs. Il est possible d'inhiber l'activité des NOS par des analogues de l'arginine tels que l'Aminoguanidine (Ag), le L-NMMA (N<sup>G</sup>-MonoMethyl-L-Arginine), le L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginine Methyl Ester) et le L-NIO (N-Iminoethyl-L-Ornithine), qui agissent comme des inhibiteurs compétitifs non sélectifs des NOS (Rees et al. 1990). Parmi ces quatre inhibiteurs, seul le L-NIO semble montrer une certaine sélectivité vis-à-vis de la NOS II. D'autres inhibiteurs sélectifs ont été décrits, tels que le L-NIL (L-N-Iminoethyl lysine) (Moore et al. 1994) et le 1400W (Garvey et al. 1997) qui agissent comme des inhibiteurs spécifiques de la NOS II, en se fixant sur une partie du site de fixation de la L-

arginine (partie guanidine du site de fixation). De plus, l'activation de la NOS II peut être régulée de façon négative par des cytokines anti-inflammatoires (Saura et al. 1996), les glucocorticoïdes (O'Connor and Moncada 1991) (Radomski et al. 1990) (Di Rosa et al. 1990) (McCall et al. 1991) ou encore des drogues telles que la cyclosporine A et le methotrexate (Hattori and Nakanishi 1995). Il faut noter enfin que d'autres inhibiteurs non sélectifs de NOS agissent en se liant à l'hème de la NOS entraînant une destruction de l'hème et donc une inhibition de la NOS, comme certains imidazoles.

## **2.4 Double activité de la NOS II : Couplage et découplage enzymatique**

Il a été montré en milieu acellulaire que la NOS II était capable de produire du NO ou des radicaux libres. Il s'agit respectivement des processus de couplage et découplage de l'enzyme. On parle de couplage enzymatique lorsque le cofacteur BH4 et le substrat (L-arginine) sont présents en fortes concentrations. Dans ces conditions il y a production de NO. A l'inverse un découplage se produit aux faibles concentrations en BH4 et L-arginine et il y a alors production de ROS (Wells and Holian 2007). Quand les NOS sont fortement activées et partiellement découplées par une déficience en BH4 par exemple, elles se comportent comme des peroxy-nitrites synthases. C'est-à-dire qu'elles synthétisent les deux précurseurs d'ONOO-, NO et superoxyde (Pall 2007). Le ONOO- peut oxyder le BH4 et limiter sa biodisponibilité (Kohnen et al. 2001; Kuhn and Geddes 2003; Kuzkaya et al. 2003; Channon 2004). Ainsi, une boucle impliquant une déplétion de BH4 enclenchée par le peroxy-nitrite et résultant en un découplage de la NOS qui en retour va augmenter la formation des peroxy-nitrite peut être envisagé. Ce cycle devrait se dérouler au niveau local. En effet, les demi-vies du NO, du ONOO- et du superoxyde sont relativement courtes de telle sorte qu'ils diffusent sur de courtes distances à partir de leur lieu de production et agissent au niveau local. Comme la synthèse du NO par les NOS est concentrée dans certains compartiments cellulaires, les superoxydes produits doivent être particulièrement actifs en réagissant avec le NO et donnant du ONOO- (figure 14).



**Figure 14:** schéma de découplage enzymatique des NOS. Dans les conditions d'équilibre en cofacteur enzymatique BH4 et en substrat L-Arginine, la NOS est habilitée à produire du NO. Contrairement au déséquilibre en cofacteur et substrat qui induit le découplage de l'activité NOS qui produit alors l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ).

#### Rôle de la L-arginine

L'arginine est un acide aminé catabolisé dans une même cellule par différentes voies. La principale voie de dégradation de la L-arginine reste celle faisant intervenir les NOS qui la transforme en NO et L-citrulline, puis les arginases (ARG1 et ARG2) qui la transforment en L-ornithine et urée. Il existe des transporteurs transmembranaires spécifiques de l'arginine qui régulent la disponibilité de ce substrat pour ces différentes enzymes (Wu and Morris 1998). Fligger et al., montrent dans un modèle de macrophages murins que lorsque l'expression de ces enzymes est induite, la production de NO ne devrait pas être affectée puisque la L-arginine doit être métabolisée approximativement au même taux par la NOS II et les ARGs (Fligger et al. 1999). En effet, même si les ARG ont une plus faible affinité pour l'arginine que la NOS II ( $K_m$  ARG1 et ARG2 est 3000 fois celui de la NOS II), elles catalysent la réaction ( $V_{max}$ ) 1000 fois plus vite que la NOS II. L'arginine entraîne la dimérisation donc l'activation des NOSs. Une stimulation par des cytokines telles que l'IL1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  dans des kératinocytes murins dans des conditions de faible concentration en L-arginine augmente l'expression de l'ARNm de la NOS II mais sa traduction en protéine est diminuée,

ce qui mène à une production de NO diminuée. Cependant, diminuer les concentrations en L-arginine dans l'environnement local, peut mener la NOS II à changer sa fonction principale de production de NO en production d'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) (Xia and Zweier 1997; Xia et al. 1998; Bronte et al. 2003). Quand les concentrations de L-arginine sont sous-optimales, les domaines réductase et oxygénase de la NOS II transfèrent les électrons au co-substrat  $O_2$  et produisent du  $O_2^-$ , qui réagit avec d'autres molécules, générant ainsi plusieurs RNOS (reactive nitrogen oxide species) comme l'anion péroxynitrite ( $ONOO^-$ ) et des ROS (reactive oxygen species), tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ce phénomène est appelé découplage enzymatique de la NOS II. Les trois isoformes de NOS sont capables de synthétiser des  $O_2^-$  en l'absence des substrats L-arginine et BH4 (Lechner et al. 2005).

#### *Rôle du BH4*

La synthèse du NO est régulée de manière post-traductionnelle, à travers le BH4, cofacteur essentiel pour la catalyse enzymatique par les NOS. Le BH4 se lie étroitement au site actif de l'hème à l'interface entre les deux monomères afin d'induire le maintien et la stabilisation des dimères de NOS (Raman et al. 1998). Ce cofacteur a aussi un rôle direct dans l'oxydation de la L-arginine via l'intermédiaire de la N-hydroxy-L-arginine et la génération conséquente de NO (Channon 2004). En effet, il permet le transfert d'électron à partir de l'hème prosthétique à la L-arginine. Lorsque le BH4 est retrouvé en quantité limitée ou est absent, la biochimie des NOS se trouve altérée. Dans un premier temps, la dimérisation se trouve déstabilisée, ce qui mène à une réduction de la proportion des dimères par rapport aux monomères présents dans la cellule. Dans un second temps, c'est l'activité catalytique qui se trouve modifiée, la NOS se découple ; à ce moment, le couplage stoéchiométrique entre le domaine réductase et l'oxydation de la L-arginine au niveau du site actif est perdue. Cependant, le transfert d'électron à partir du NADPH au travers des flavines jusqu'à l'oxygène moléculaire n'est pas inhibé, mais résulte en une formation de superoxyde ( $O_2^-$ ) et/ou de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) plutôt que du NO. Il s'agit du processus de découplage enzymatique des NOS. Ce découplage a d'abord été décrit pour les NOS endothéliales (Vasquez-Vivar et al. 1998; Kuzkaya et al. 2003) et neuronale (Vasquez-Vivar et al. 1999; Cardounel et al. 2005), avant d'être démontré pour la NOS II (Xia et al. 1998; Huisman et al. 2002).

### 3. Les thérapies via le NO

#### 3.1 Rôle ambiguë du NO dans la cancérogénèse

Au cours de la dernière décennie, le NO a émergé comme une molécule d'intérêt dans la suppression de la croissance et de la carcinogénèse des tumeurs. Le NO joue un rôle ambivalent dans la carcinogénèse, il peut être un médiateur pro-tumoral ou anti-tumoral. Il a été décrit pour faciliter la croissance tumorale lorsqu'il est produit par les cellules stromales ou s'opposer à cette croissance lorsqu'il est produit par les cellules cancéreuses (Gauthier et al. 2004). En effet, le rôle du NO dans le développement du cancer est paradoxal. Dans la littérature, les effets de faibles concentrations de NO sont en général qualifiés de pro-tumoraux, alors qu'à très fortes concentrations, le NO agit comme un puissant agent anticancéreux favorisant l'apoptose et la nécrose, et inhibant l'angiogénèse (Huerta et al. 2008). Il est connu pour réagir avec les métaux ou avec l'oxyhémoglobine et la guanylate cyclase formant de l'AMPC lorsqu'il est présent en faible concentration. Sa réaction avec les MMP (Matrix MetalloProteinase) induit la dégradation de la matrice extracellulaire et favorise la migration des cellules tumorales. Il est décrit comme pouvant stimuler l'angiogénèse au sein des tumeurs. Produit à forte concentration, il est connu pour réagir avec les acides gras, les résidus tyrosine et les thiols. Il forme avec l'O<sub>2</sub> des nitrites et nitrates et plus récemment, il a été décrit pour réagir avec l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pour former des peroxynitrites toxiques pour les cellules (Pall 2007). D'autre part, le NO est décrit pour être un élément essentiel de la réponse immunitaire anti-tumoral. Par exemple, les cellules dendritiques sont capables de bloquer la croissance tumorale par un mécanisme dépendant du NO (Nicolas et al. 2007). De plus, la mise en évidence du pouvoir tumoricide du NO produit par la NOS II des macrophages reste l'une des découvertes majeures qui a démontré que ce radical est généré *in vivo* et qu'il peut exercer un rôle protecteur ou toxique dans un contexte tumoral (Hibbs et al. 1988). Plus récemment, il a été montré que la surexpression de la NOS II réduit *in vitro* la prolifération cellulaire et la progression tumorale dans des modèles de xénogreffes utilisant différents types de lignées cancéreuses (Jenkins et al. 1995; Xie et al. 1995; Ambs et al. 1998; Le et al. 2005). Dans un autre travail, le NO produit par la NOS II abroge la lymphogénèse même dans un fond génétique p53<sup>-/-</sup> en induisant l'apoptose et une diminution de la prolifération cellulaire (Hussain et al. 2004).

### **3.2 Rôle du NO dans la sensibilisation à la mort des cellules tumorales**

La sensibilisation à la mort des cellules tumorales par le NO ou la levée de la résistance à la mort des cellules tumorales par le NO est un concept nouveau. Il s'appuie sur de nombreuses études qui montrent que l'activation de la NOS II ou qu'un donneur de NO sensibilise des cellules cancéreuses à des cytokines ou à des agents cytotoxiques inefficaces par eux-mêmes ou aux doses utilisées (Bonavida and Baritaki 2011; Leon-Bollotte et al. 2011). L'association de donneurs de NO ou d'agents modulateurs de l'activité des NOS est décrite pour augmenter les effets des thérapies conventionnelles telles que la radiothérapie, la chimiothérapie ou l'immunothérapie. Par exemple, des donneurs de NO sensibilisent des cellules tumorales à des médicaments anticancéreux par nitrosylation d'enzymes de réparation de l'ADN (Laval and Wink 1994). D'autres travaux montrent une sensibilité accrue des lignées cancéreuses aux effets toxiques des chimiothérapies telles que le cisplatine (Wink et al. 1997) et le melphalan (Cook et al. 1997) et des rayonnements ionisants (Wood et al. 1993). D'autre part, il a été rapporté que la surexpression de la NOS II dans les tissus cancéreux est associée à un mauvais pronostic chez les malades atteints de cancer.

La concentration en NO reste l'élément central de son rôle paradoxal dans la sensibilisation à la mort des cellules tumorales. Il est admis que de grandes quantités de NO (de l'ordre du millimolaire) sont requises pour tuer les cellules cancéreuses, par l'intermédiaire notamment de la formation de nitrosamines carcinogènes. Par exemple, le donneur de NO SNAP (S-Nitro-N-Acétyl-Pénicillamine) augmente l'angiogenèse de moitié lorsqu'il est utilisé à faibles concentrations (générant entre 12 et 26  $\mu\text{M}$  de nitrites) alors que les concentrations plus fortes perdent progressivement leur effet, avec un taux maximum d'inhibition de 80 % atteint pour la plus forte concentration (générant 281  $\mu\text{M}$  de nitrites) (Jones et al. 2004). Les mêmes enzymes cibles sont activées à faibles concentrations alors que de grandes quantités de NO les inhibent. A l'inverse, de faibles doses de NO sont capables d'avoir un effet anti-tumoral dans un environnement particulier comme l'hypoxie. En effet, l'hypoxie induit des modifications cellulaires qui permettent aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire. Le GTN à très faibles concentrations (de l'ordre du nanomolaire) en conditions hypoxiques lève cette résistance (Siemens et al. 2008). Ces résultats renforcent l'importance du micro-environnement dans la signalisation du NO.

Le donneur endogène, GTN est le dérivé nitré le plus utilisé au niveau clinique, depuis plus d'un siècle. En effet, il a été développé dans le traitement des angines de poitrine, de l'insuffisance cardiaque ou encore des infections du myocarde. Ce puissant vasodilatateur

permet d'augmenter le débit sanguin vers le cœur en dilatant les vaisseaux sanguins dans le but d'éviter l'ischémie cardiaque (Leesar et al. 2001). Les propriétés du GTN sont également exploitées dans le traitement de la douleur (Lauretti et al. 2002; Higa et al. 2004) ou encore dans la préservation des organes pour la transplantation (Loeche et al. 2004).

Dans le domaine de la thérapie anti-tumorale, le GTN a fait l'objet de plusieurs essais cliniques de phase I/II qui ont montré son intérêt en tant qu'adjuvant. Un essai clinique randomisé de phase I/II sur 120 patients, rapporté par Yasuda *et al.* (Yasuda *et al.* 2006) montre que l'utilisation du GTN en combinaison avec la chimiothérapie vinorelbine/cisplatine augmente le taux de réponse et ralentit la progression de la maladie chez des patients inopérables atteints de cancer de poumon non à petites cellules (Yasuda et al. 2006).

Plus récemment, il a été montré la capacité du GTN à augmenter le temps de doublement du PSA (*Prostate-Specific Antigen*), marqueur pronostique de la progression tumorale dans le cancer de la prostate (Siemens et al. 2009). En effet, le taux sérique de PSA augmente progressivement avec l'âge.

Dans notre laboratoire, il a été montré que le monoxyde d'azote produit par l'activation de la NO-synthase inductible ou par le GTN peut sensibiliser *in vitro* des cellules cancéreuses à la mort induite par des cytokines (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) ou par des agents cytotoxiques (FAS ligand) peu efficaces par eux-mêmes (Leon-Bollotte et al. 2011). En effet, l'administration intra-tumorale du GTN dans un modèle subcutané de cancer colique murin diminue le volume tumoral (Prevotat et al. 2006). Nos résultats montrent que de fortes concentrations de GTN induisent l'apoptose des cellules cancéreuses coliques humaines, alors qu'à des concentrations pharmacologiques, le GTN n'est pas toxique (Millet et al. 2002). Il le devient lorsqu'il est associé à un inhibiteur de kinases (Cortier et al, en soumission). Paradoxalement, d'autres travaux montrent que le NO par sa capacité à inhiber par S-nitrosylation de la prolyl hydrolase (Enzyme qui dégrade HIF-1 $\alpha$ ) stabilise HIF-1 $\alpha$  et permet son accumulation et favorise l'angiogenèse (Kimura et al. 2001; Metzen and Ratcliffe 2004).

#### **4. Mécanismes moléculaire du NO**

Une fois synthétisé le NO réagit très rapidement avec des molécules intra-cellulaires et/ou sur des cellules voisines selon un mode paracrine. Le NO diffuse à travers la membrane cellulaire des cellules cible, et interagit avec ses molécules cibles intracellulaires. Sa grande instabilité intrinsèque fait que le NO ne nécessite pas de mécanisme spécifique de dégradation. Il a été montré que le NO est une molécule très réactive dont les effets sont



extrêmement variés et dépendent essentiellement de la concentration du NO et du milieu environnant son site de synthèse. L'interaction du NO avec la guanylate cyclase (GC), est le mécanisme d'action principal des effets physiologiques du NO. De ce fait, le NO régule les processus physiologiques dans l'organisme via deux principaux mécanismes d'action : dépendant et indépendant de la GC.

#### **4.1 Voie dépendante de la GC**

La plupart des fonctions physiologiques du NO dans les systèmes cardiovasculaire, neuronal ou gastro-intestinal dépendent de l'isoforme cytosolique de la guanylate cyclase, sGC (*soluble Guanylate Cyclase*). Cette voie dépendante du cGMP est la principale voie par laquelle le NO exerce la plupart de ses fonctions biologiques (Blaise et al. 2005). La guanylate cyclase soluble forme un complexe stable avec le NO et le monoxyde de carbone mais pas avec l'O<sub>2</sub>. Dans cette voie, le NO se lie sur la fraction de l'hème de l'enzyme soluble guanylate cyclase (sGC) conduisant à la production du second messager du GTP, le cGMP. Ce dernier, entraîne l'activation des protéines kinases dépendantes du GMPc, de certaines phosphodiésterases, des canaux ioniques dépendants du cycle nucléotide (Ahern et al. 2002). Cette signalisation est impliquée dans les principales fonctions biologiques du NO, dont la vasodilatation, la neurotransmission, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la relaxation des muscles lisses (Blaise et al. 2005).

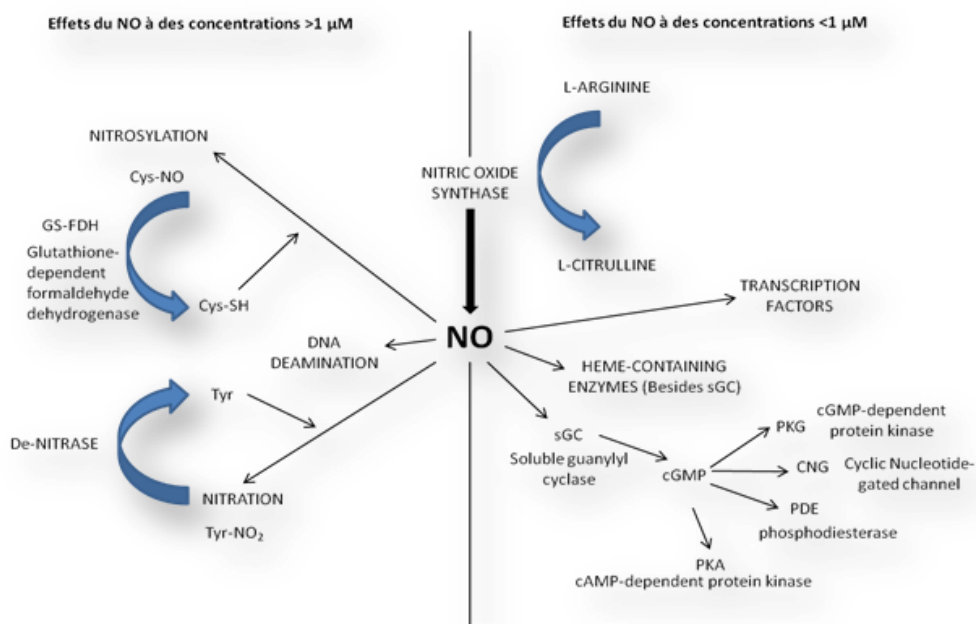
#### **4.2 Voie indépendante de la GC**

La voie indépendante du GMPc ne nécessite pas l'intervention d'enzyme et consiste en la réaction directe du NO avec une molécule d'O<sub>2</sub>, l'anion superoxyde, une fonction thiol ou des métaux. On reconnaît deux effets directement liés à la molécule elle-même et un effet indirect du NO à travers les espèces réactives de l'azote (RNS) produites par l'interaction du NO avec l'anion superoxyde ou avec l'oxygène (figure 15):

- ✓ En réagissant avec des métaux de groupements prosthétiques d'enzymes ou de protéines comme le fer, le cuivre ou le zinc, le NO peut exercer une activité régulatrice de nombreuses enzymes, dont la guanylate cyclase. Ce processus est nommé métal-nitrosylation (M-NO)

- ✓ En formant des S-nitrosothiols grâce à sa fixation covalente sur les cystéines présentes sur la protéine par S-nitrosylation (S-NO). Ce mécanisme de nitrosylation est décrit pour réguler l'activité de nombreuses enzymes et est réversible.
- ✓ En réagissant très rapidement avec l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) entraînant ainsi la formation de peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), qui du fait de son fort pouvoir oxydant est à l'origine de la tyrosine nitration des protéines (Y-NO), la peroxydation des lipides et la déamination des acides nucléiques. En effet, le NO n'attaque pas directement l'ADN, mais ce sont plutôt ses dérivés nitrés (Wink et al. 1991).

Il faut noter que la métal-nitrosylation est considérée comme un mécanisme direct (c'est à dire que le NO subit un changement au niveau de sa conformation électronique), tandis que la S-nitrosylation et la tyrosine nitration sont qualifiés de mécanismes indirects. De plus, à de faibles concentrations ( $<1\mu M$ ), l'effet direct est prédominant, alors qu'à des concentrations plus élevées ( $>1\mu M$ ), les effets indirects deviennent plus importants. En effet, des concentrations  $<1\mu M$  inhiberaient réversiblement la cytochrome c oxydase (Shiva et al. 2001), ce qui pourrait augmenter transitoirement la perte de  $O_2^-$  de la chaîne de transport des électrons et générer potentiellement des peroxynitrites altérant irréversiblement la mitochondrie. De plus, de grandes quantités d'oxygène sont requises pour maintenir la synthèse du NO dans des concentrations micromolaires (Pacher and Szabo 2007).



**Figure 15:** Principaux effets du NO à faible et forte concentration. Source : (Hanafy et al. 2001). *La multitude de réactions qui implique le NO va dépendre, entre autres, de la concentration de NO, du microenvironnement et du lieu de production de NO. Les fortes concentrations induisent la nitrosylation et ou la nitration des protéines alors que les faibles concentrations agissent sur les facteurs de transcriptions ou font intervenir la voie du cGMP.*

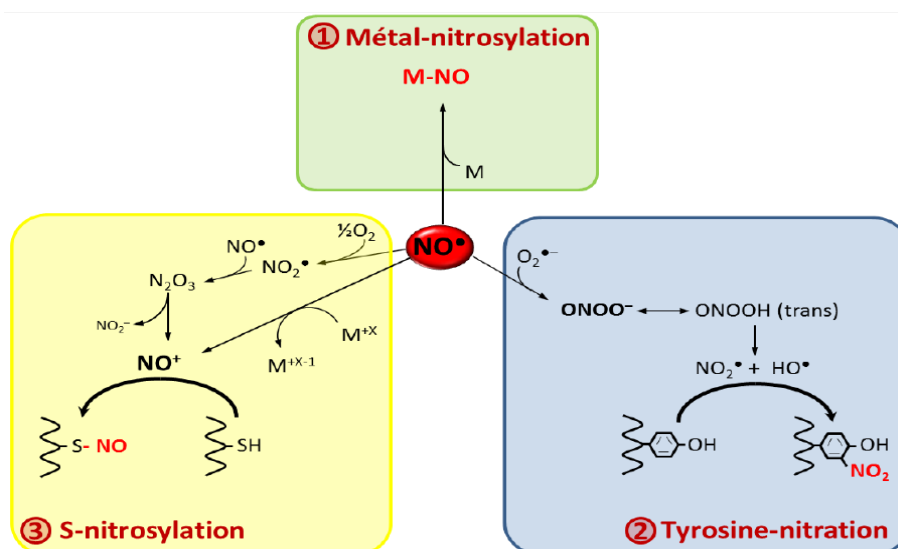
### 4.3 Formation de RNS et de peroxynitrites toxiques

La réaction entre le NO et l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) induit la formation de peroxynitrite  $ONOO^-$  (Pall 2007). Cette réaction extrêmement rapide est favorisée par la présence en concentration suffisante et équivalente des espèces NO et  $O_2^-$ . Cette espèce oxydante hautement réactive endommage des cibles biologiques (Radi 2004) et induit une modification post-transcriptionnelle des protéines en nitrant les résidus tyrosine. A fortes concentrations,  $ONOO^-$  peut contrôler directement la mort des cellules par nitration et altérer les mitochondries (Aulak et al. 2001). Il a été rapporté que l'inhibition des NOS aboutirait à l'inhibition de la nitration de certaines protéines telles que l'enzyme mitochondriale MnSOD (Radi 2004). Les sources de superoxyde ( $O_2^-$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) peuvent être discriminées avec des inhibiteurs de NAD (P)H oxydases, xanthine oxydase, des découplants de la chaîne respiratoire ; si le mécanisme de nitration est dépendant des  $ONOO^-$ , il devrait être inhibé par la superoxyde dismutase (SOD). De fortes concentrations en NO et

ONOO<sup>-</sup> inhibent les activités des complexes I et II dans le complexe respiratoire, l'ATP synthase, l'aconitase, la créatine kinase, la SOD et altère l'ADN et les membranes mitochondriales, dont le rôle dans la phosphorylation oxydative est primordial (Borutaite et al. 2000; Brown and Borutaite 2001). Les RNOS (Espèces Reactives de l'Azote) et ONOO<sup>-</sup> peuvent également moduler l'activité de certaines enzymes, telles que celle du processus inflammatoire et des fonctions vasculaires, notamment la prostaglandine endoperoxyde synthase, le cytochrome P450 et le métabolisme de la 5-lipoxygénase (Yamamuro et al. 1975). Bien que le peroxy-nitrite soit un oxydant fort, il réagit lentement avec la plupart des molécules biologiques. Il est capable de traverser les membranes cellulaires, en partie à travers les canaux anioniques (Denicola et al. 1998).

## 5. Modifications post-traductionnelles des protéines induites par le NO

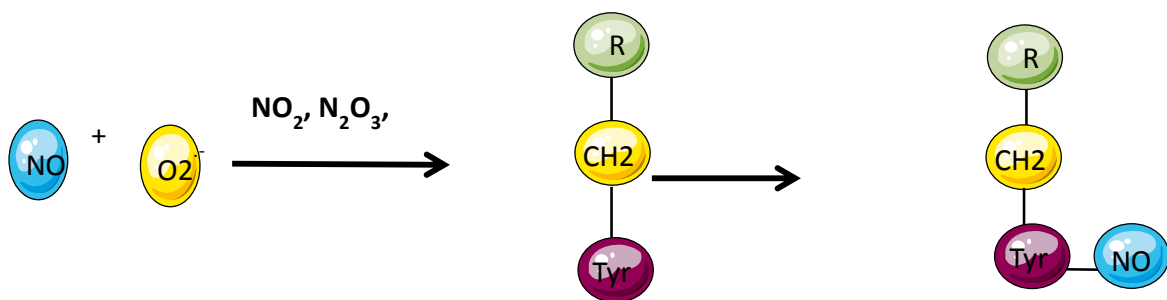
Comme nous l'avons indiqué précédemment, le NO est une espèce radicalaire. Les études conduites *in vivo* dès les années 1990 montrent que le NO et certains de ses dérivés modulent l'activité de protéines *via* trois principaux types de modifications post-traductionnelles : la métal-nitrosylation, la tyrosine nitration et la S-nitrosylation (figure 16) pour revue voir (Hess et al. 2005).



**Figure 16:** les modifications post-traductionnelles induites par le NO. (1) le radical NO peut céder un électron et réagir avec les métaux de transition des métalloprotéines. Ce processus est appelé métal-nitrosylation. (2) la Tyr-nitration dépend de la formation de dérivés du NO, notamment le peroxy-nitrite ONOO<sup>-</sup> formé en présence de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). (3) la S-nitrosylation correspond à l'attaque électrophile du cation nitrosium (NO<sup>+</sup>, résultant de l'oxydation du NO) sur un groupement thiolate d'un résidu cystéine d'une protéine cible. (Source : (Besson-Bard et al. 2008)).

## 5.1 La tyrosine nitration

La tyrosine nitration correspond à l'addition d'un groupement nitrite ( $\text{NO}_2^+$ ) sur un résidu Tyrosine, conduisant à la formation de 3-nitrosotyrosine. Cette modification post-traductionnelle est généralement irréversible (Hanafy et al. 2001). Le groupement  $\text{NO}_2^+$  provient du radical dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2\cdot$ ), un agent oxydant issu de la réaction entre le NO et l' $\text{O}_2$ , ou de la décomposition du  $\text{ONOO}^-$  (figure 17). Dans des conditions physiologiques, l' $\text{ONOO}^-$  réagit principalement avec le  $\text{CO}_2$  pour former le radical carbonate ( $\text{CO}_3\cdot^-$ ) et  $\text{NO}_2$  et se comporte donc comme un agent de nitration.



**Figure 17:** réaction de Tyrosine-nitration. Le NO produit dans les cellules réagit avec les anions superoxydes pour former des RNS qui sont à l'origine de la nitration des protéines contenant un résidu tyrosine.

Il a été montré *in vivo* que la Tyrosine nitration augmente la susceptibilité des protéines à la protéolyse (Souza et al. 2000) et la plupart des protéines Tyr-nitrées *in vivo* sont inhibées par cette modification (Hanafy et al. 2001). La formation de nitrotyrosine a été observée dans plusieurs contextes pathologiques comme l'athérosclérose et la myocardite (Turko and Murad 2002). La nitrotyrosine est utilisée comme un marqueur de formation de peroxynitrites, de lésions tissulaires ainsi qu'un marqueur de survenue de modifications fonctionnelles des protéines. En effet, la nitration des protéines et des enzymes entraîne une modification de leur activité catalytique, de leur capacité d'agir comme signal cellulaire ainsi qu'une modification structurelle du cytosquelette. Par exemple, l'activité de la NOS II est diminuée par une nitration induite par le  $\text{ONOO}^-$ . Enfin, il faut noter que le NO peut être à l'origine de nitration de protéines sans formation d' $\text{ONOO}^-$ , comme c'est le cas pour les cyclo-oxygénases.

Il existe actuellement plusieurs études cliniques impliquant l'effet sensibilisateur du NO aux thérapies anticancéreuses ((Yasuda et al. 2006; Siemens et al. 2008). Ainsi, l'augmentation des peroxynitrites mitochondriaux *via* la stimulation de la NOS

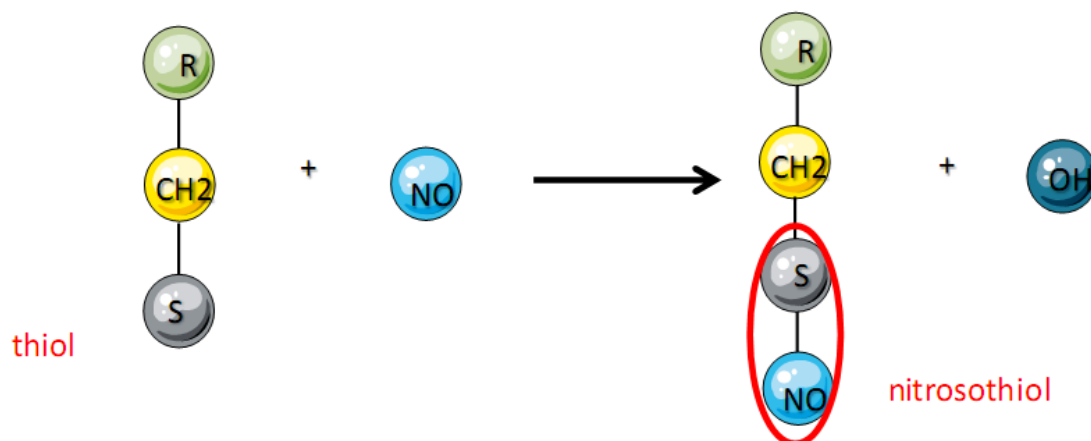
mitochondriale (mtNOS) par le tamoxifène induit l'apoptose de cellules cancéreuses mammaires humaines (Nazarewicz et al. 2007). La nitration peut aussi moduler l'apoptose induite par les récepteurs de mort. La nitration de Fas empêche par exemple sa phosphorylation, inhibant l'apoptose des cellules Huh 7 en réponse à FasL (Wiseman and Halliwell 1996).

## 5.2 La métal-nitrosylation

La métal-nitrosylation est un mécanisme réversible désignant l'établissement d'une liaison covalente entre le NO et un métal de transition d'une métalloprotéine. En effet, le NO en tant que donneur d'électron réagit avec les métaux de transition comme le fer, le cuivre ou le zinc, conduisant à la formation de complexes métal-nitrosyles. C'est le cas dans l'activation de la guanylate cyclase soluble (sGC). Plus précisément, le NO établit une liaison covalente avec le fer hémique de l'enzyme. Ceci s'accompagne d'un changement conformationnel accélérant formation du GMPc (Ahern et al. 2002).

## 5.3 La S-nitrosylation

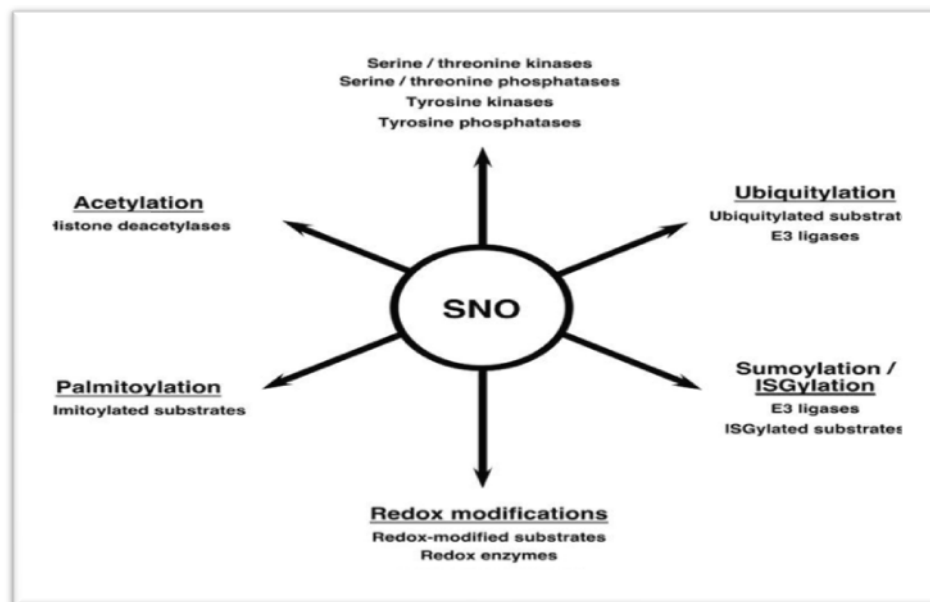
La S-nitrosylation quant à elle, correspond à la formation réversible d'une liaison covalente entre une molécule de NO et un résidu cystéine (Cys) d'une protéine cible, conduisant à la formation d'un S-nitrosothiol (S-NO) (Hess et al. 2005) (figure 18).



**Figure 18** : réaction de S-nitrosylation

La S-nitrosylation n'a été établie qu'au cours de la dernière décennie et elle suscite un intérêt grandissant car elle est décrite pour réguler la fonction d'un large spectre de protéines dans de nombreux types cellulaires. La littérature répertorie aujourd'hui quelques milliers de protéines pouvant être S-nitrosylées. En effet, cette modification apparaît actuellement, parmi les modifications post-traductionnelles qui transmettent des signaux cellulaires. On peut donc comparer l'ampleur de l'influence de la S-nitrosylation à celle de la phosphorylation ou de l'ubiquitination.

De nombreuses études récentes mettent en exergue le rôle de la S-nitrosylation comme un régulateur des modifications post-traductionnelles des protéines, telles que la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, la palmitoylation ou encore l'ubiquitination (Figure 19).



**Figure 19:** Résumé schématique des principaux mécanismes post-traductionnels régulés par S-nitrosylation. *Source : (Hess and Stamler 2012).*

Le tableau 4 résume quelques protéines S-nitrosylées et l'effet de cette modification sur leurs fonctions.

Protein name	Gene name	Pathway
Type-1 angiotensin II receptor	AGTR1	Receptor signaling
Dynamin-1/2	DYN1, DYN2	
Insulin receptor	INSR	
NMDA receptor	NMDAR2A, NMDAR1	Signal transduction
Beta-arrestin-2	ARRB2	
MAP kinase 8	MAPK8	
Protein-tyrosine phosphatases, PTP1B, SHP1	PTP1B, PTP1C	
Dexamethasone-induced Ras-related protein 1	DEXRAS1	Muscle contraction
GTPase HRas, NRas	HRAS, NRAS	
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase	ATP2A1	
Myosin-9	MYH9	
Ryanodine receptor 1/2	RYR1, RYR2	Apoptosis
Apoptosis regulator Bcl-2	BCL2	
Caspase-3, caspase-9	CASP3, CASP9	
E3 ubiquitin-protein ligase XIAP	XIAP	NO synthesis
Arginase-1	ARG1	
Argininosuccinate synthase	ASS1	Redox regulation
Nitric oxide synthase, endothelial	NOS3	
Glutaredoxin-1	GRX	
Thioredoxin-1	TRX1	Heat shock response
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	Gene regulation
Elongation factor 1-alpha	EF1A	
Histone deacetylase 2	HDAC2	
Hypoxia-inducible factor 1-alpha	HIF1A	Circulation
Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase	IKKB	
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II	CAMK2A	
E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	MDM2	Protein homeostasis
Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	NFKB1	
Tumor necrosis factor receptor superfamily	TNFRSF10A	
Hemoglobin	HBA1; HBA2	Membrane channels
Tissue-type plasminogen activator	PLAT	
Voltage-gated potassium channel	KCNA8, KCNA5	Respiratory chain
Cytochrome c oxidase subunit 2	MT-CO2	
Protein disulfide isomerase	PDI	Others
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UBE2L3	
Cytosolic phospholipase A2	PLA2G4A	
Glucokinase	GCK	
Iron-responsive element-binding protein 2	IREB2	
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	
Microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1	
Syntaxin-1A	STX1A	
Vesicle-fusing ATPase	NSF	

**Tableau 4:** représentation de quelques protéines S-nitrosylées et leurs fonctions cellulaires.

Source : (Seth and Stamler 2011).

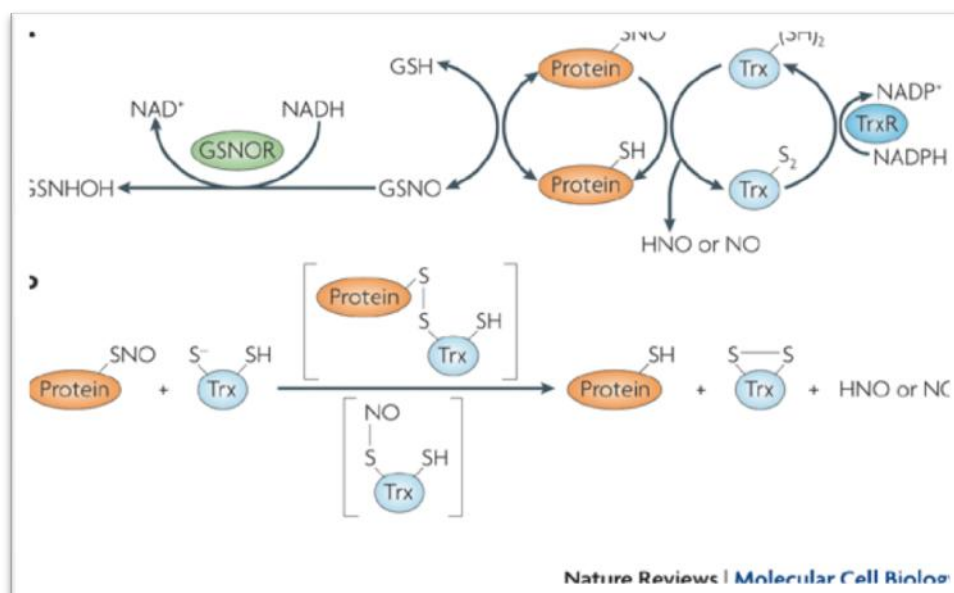
## 5.4 Régulation de la S-nitrosylation par la dénitrosylation

La liaison S-NO formée par la S-nitrosylation est en effet très labile, photosensible et sensible aux variations du statut d'oxydo-réduction de l'environnement (figure 20). Par conséquent, la liaison S-NO peut être réduite par l'action d'agents réducteurs intracellulaires tels que le GSH et l'acide ascorbique, ou encore par certains ions métalliques réducteurs. Néanmoins, la dénitrosylation des protéines semble soumise à une régulation très contrôlée. En effet, des travaux relativement récents suggèrent que des enzymes peuvent catalyser la dénitrosylation de façon spécifique (figure 20). Chez les mammifères, quelques enzymes présentant une activité dénitrosylase ont été identifiées. On peut citer une disulfure isomérase, la xanthine oxydase, une carbonyl réductase, la GSH peroxydase, la superoxyde dismutase et



le système thioredoxines/thioredoxines reductases (Trx/TR) (pour revue, voir (Benhar et al. 2009)).

Par exemple, il a été démontré dans des cellules T humaines engagées en apoptose que les Trx réduites dénitrosylent la caspase 3. Cette dénitrosylation favorise l'activation de la caspase 3 et induit un processus apoptotique (Benhar et al. 2008). Les événements de S-nitrosylation/dénitrosylation constituent des processus dynamiques qui font participer les espèces réactives dérivées du NO, des agents réducteurs et des enzymes impliquées dans le maintien de l'état redox de la cellule. L'environnement moléculaire de la Cys réactive et de la localisation subcellulaire des SNO-protéines permet de réguler les processus de nitrosylation/dénitrosylation.



**Figure 20:** (a) Mécanismes de dénitrosylation par la thioredoxine (TRX) et la S-nitrosogluthathione réductase (GSNOR). (b) autre mécanisme de dénitrosylation médié par la thioredoxine. *Source : (Benhar et al. 2009)*

## 5.5 Régulation des modifications post-traductionnelles par S-nitrosylation

### Régulation de la phosphorylation

La régulation par S-nitrosylation des protéines kinases et des phosphatases influence un grand nombre de voies de transduction de signaux cellulaires à travers la phosphorylation/déphosphorylation. Dans de nombreux cas, l'effet de la S-nitrosylation sur l'activité kinase ou phosphatase est inhibiteur, par la modification d'un seul résidu Cys. Dans le cas des kinases, l'inhibition peut être exercée directement par la suppression de l'activité kinase ou par la

modulation de son interaction avec son substrat. C'est le cas par exemple dans la voie de signalisation MAPK impliquée dans l'apoptose induite par le TNF $\alpha$ . En effet, la S-nitrosylation endogène de la kinase ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1) sur une seule Cys inhibe sa liaison à ces principaux effecteurs en aval, MKK3 et MKK6 (Park et al. 2004). Ainsi, la S-nitrosylation au niveau de Cys spécifique régulatrice exerce un effet anti-apoptotique via la modulation de la signalisation séquentielle MAPK (Park et al. 2006). D'autres serine/thréonine kinases tels que les protéines kinase C, la kinase I $\kappa$ B ou le récepteur de l'insuline retrouvent leur activité inhibée par S-nitrosylation. Plus récemment, des études ont montré que l'activité de la phosphatase PTEN (phosphatase sans tensin homolog), dont le gène a été identifié comme suppresseur de tumeurs et muté dans de nombreux cancers, est inhibée par S-nitrosylation. Une augmentation de la S-nitrosylation de PTEN a été observée dans le cerveau de patients diagnostiqués pour la maladie d'Alzheimer. Ainsi, la S-nitrosylation semble contrôler au même titre que la phosphorylation et déphosphorylation, la signalisation cellulaire.

### *Régulation de l'acétylation par S-nitrosylation*

La S-nitrosylation est décrite pour réguler la liaison, l'activité, la stabilité ou encore le ciblage nucléaire de nombreux facteurs de transcription, tels que HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  et P53 (Hess et al. 2005). De plus, la S-nitrosylation de facteurs de transcription à des sites de liaison à l'ADN ou des sites allostériques peut directement réguler la transcription de gènes au niveau nucléaire. Par exemple, c'est le cas du facteur de transcription NF $\kappa$ B dont la S-nitrosylation des résidus Cys libres inhibe sa liaison à l'ADN et son activité promotrice et par conséquent inhibe la transcription de gènes dépendant de NF $\kappa$ B. En outre, il est apparu que la S-nitrosylation peut modifier des mécanismes épigénétiques en régulant l'acétylation et la désacétylation des histones. Récemment, l'équipe de Snyder montre que la S-nitrosylation de la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), sur son unique Cys en position 150 au niveau de son site actif, sert de transporteur du signal de S-nitrosylation du cytosol vers le noyau. Ils montrent ensuite que la forme SNO-GAPDH se lie aux substrats nucléaires dont HDAC2 et la déacétylase de classe III sirtuin-1, puis leur transfère le groupement NO par un processus de trans-nitrosylation (Kornberg et al. 2010). Et par voie de conséquence inhibe l'activité de ses partenaires. Ainsi la S-nitrosylation apparaît comme un processus de régulation dans la stabilité nucléaire et la survie cellulaire.

### *Régulation de la S-palmitoylation par S-nitrosylation*

La S-palmitoylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'un acide palmitique par liaison thioester covalent au niveau des résidus cystéines d'une protéine. La S-palmitoylation est décrite pour jouer un rôle dans les fonctions et propriétés de nombreuses protéines. Cette modification influence la localisation et la stabilité subcellulaire, l'interaction protéine-protéine et la propagation du signal (Salaun et al. 2010). Etant donné que la S-palmitoylation est réversible et dynamique et ne s'opère que sur certains résidus Cys, de la même manière que pour la S-nitrosylation, il a été proposé l'existence d'une compétition entre ces deux modifications. En effet, il a été montré que l'utilisation de donneurs de NO induit une inhibition de la S-palmitoylation du B2-AR (Beta 2 Adrenergic Receptor) mammifère ainsi que du récepteur à la transferrine (Adam et al. 1999; Baker et al. 2000). Compte tenu des centaines de protéines qui sont connues pour être modifiées de façon endogène par S-palmitoylation et par S-nitrosylation, les conséquences de leur interaction peuvent s'avérer importante au sein de la cellule.

### *Régulation de l'ubiquitination par S-nitrosylation*

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle impliquée dans de nombreux processus biologiques dont la régulation du cycle cellulaire, l'endocytose des récepteurs, la dégradation des protéines et la signalisation cellulaire (voir plus bas). La S-nitrosylation a été décrite comme un inhibiteur de l'activité E3 ligase (une des trois enzymes impliquées dans l'ubiquitination) des domaines RING finger. En effet, la S-nitrosylation du domaine RING de la protéine neuronale parkin, ciblant la Cys du domaine BIR (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat motif) et du domaine RING, est augmentée dans des modèles de rongeurs parkinsoniens ainsi que dans le cerveau de patients atteints de la maladie sporadique de Parkinson, ce qui a pour conséquence d'inhiber son activité (Chung et al. 2004; Yao et al. 2004). Dans le cas de la protéine XIAP (X linked inhibitor of apoptosis protein), la S-nitrosylation qui cible les résidus Cys des domaines RING inhibe la dégradation par le protéasome de la protéase pro-apoptotique caspase 3. De plus, la S-nitrosylation de son domaine BIR entraîne le relargage de la caspase 3 et désinhibe XIAP liée à la caspase 3, ce qui a pour conséquence d'entraîner la mort cellulaire.

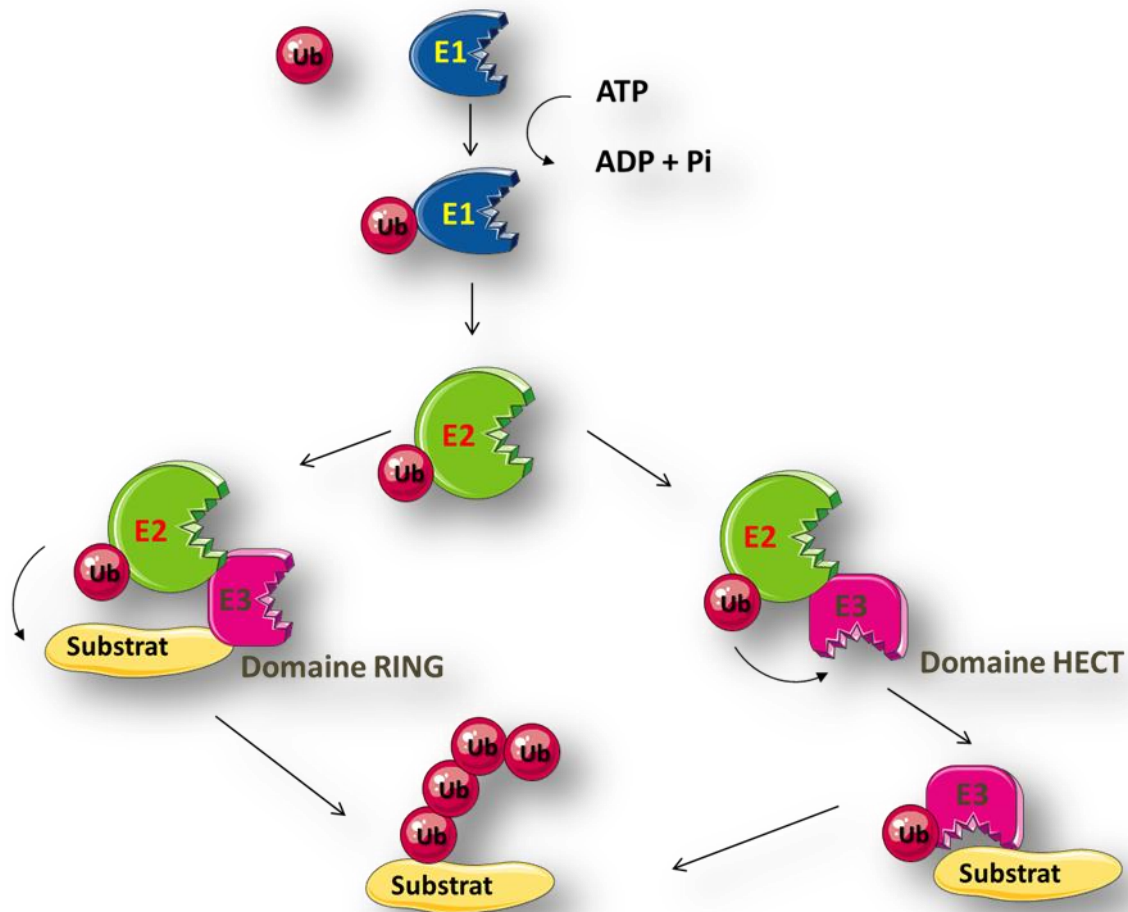
Aussi, il a été montré un taux élevé de SNO-XIAP dans le cerveau de patients atteints de maladies neurodégénératives (Tsang et al. 2009; Nakamura et al. 2010). Reynaert et collaborateurs montrent que la S-nitrosylation de IKKB (IκB kinase B) sur sa Cys-179 inhibe la phosphorylation de IκB (inhibitor of NFκB), régulant ainsi l'adressage au protéasome des facteurs de transcription NFκB et IκB (Reynaert et al. 2004). Il existe plusieurs centaines d'E3 ligases au sein du règne mammifère, qui sont réparties entre au moins quatre classes mécanistiques distinctes. Les données concernant l'influence de la S-nitrosylation sur la fonction des enzymes de la voie de l'ubiquitine, qui possèdent des fonctions thiols ou des résidus Cys au niveau de leur site actif, reste peu exploré. Compte tenu du rôle possible de la S-nitrosylation dans la régulation de la signalisation et de la dégradation protéique médiée par l'ubiquitine, nous avons porté notre intérêt sur la compétition entre ubiquitination et S-nitrosylation.

#### **IV. Ubc13 : ubiquitin conjugating enzyme (E2N)**

##### **1. Signalisation des ubiquitine enzymes**

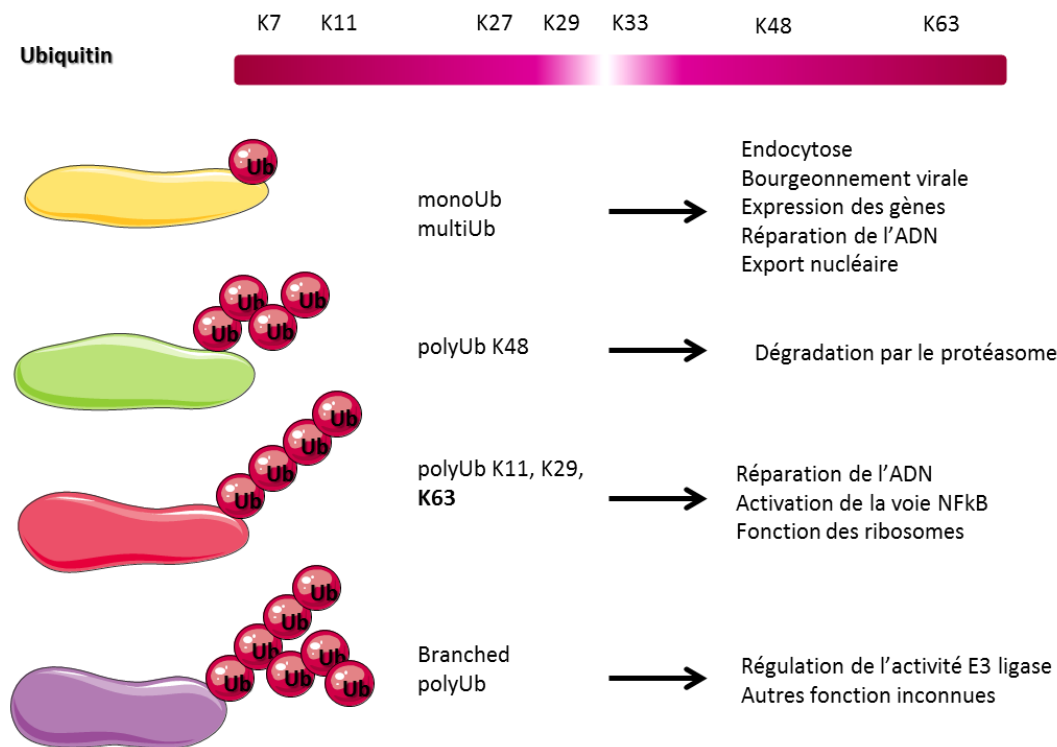
L'ubiquitination nécessite plusieurs étapes conduisant à la fixation covalente rapide et réversible d'une molécule d'ubiquitine (Ub) sur le groupe ε-amino d'un résidu lysine (K ou Lys) des protéines cibles et régule divers processus cellulaires (Weissman et al. 2011). La découverte de cette petite protéine cellulaire eucaryote ubiquitaire a valu l'attribution du prix Nobel de chimie à Avram Hershko, Aaron Ciechanover et Irwin Rose en 2004. Cette réaction fait intervenir une cascade enzymatique séquentielle impliquant trois classes d'enzymes : une enzyme d'activation de l'Ub (E1), une enzyme de conjugaison de l'Ub (E2 ou Ubc), et une ligase de l'Ub (E3). L'enzyme E1 active l'ubiquitine dans un contexte dépendant de l'ATP et transfère l'ubiquitine activée à une enzyme E2 par la formation d'une liaison thioester entre l'extrémité carboxy-terminale du résidu glycine (C ou Gly) de l'ubiquitine et la Cys de site actif de l'E2, pour générer un conjugué E2 et Ub thioester (notée E2 ~ Ub). L'E2 peut alors transférer directement l'Ub sur la protéine substrat ou coopère avec une E3 pour attacher l'ubiquitine à un résidu lysine de la protéine substrat. L'ubiquitine elle-même peut servir de substrat et le procédé peut se répéter plusieurs fois, conduisant à la formation de chaînes de polyubiquitine. (Weissman et al. 2011; Wenzel et al. 2011). Ces enzymes facilitent la liaison de l'ubiquitine à la protéine cible. L'intervention d'une enzyme E4 dans la formation de

chaînes de polyubiquitines de plus de quatre unités d'Ub a été décrite (Koege et al. 1999) (Figure 21).



**Figure 21:** cascade enzymatique d'ubiquitination. L'ubiquitine est d'abord activée par l'enzyme d'activation E1 de façon ATP dépendante pour pouvoir être transférée sur l'enzyme de conjugaison E2. L'ubiquitine est ensuite transférée soit directement sur son substrat par l'E2 soit sur une enzyme de liaison E3 pour finalement être transférée au substrat.

Comme l'ubiquitine possède sept résidus lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) et que chacune peut se conjuguer à une autre ubiquitine, des chaînes d'ubiquitine de liaisons différentes avec des propriétés fonctionnelles distinctes peuvent être formées dans des cellules. Les fonctions physiologiques de la polyubiquitination en K48 suivi de celle en K11 et K63 respectivement sont les mieux décrites, contrairement à celle en K6, K27 et K33 (Adhikari and Chen 2009) (Figure 22).



**Figure 22:** structure schématique de l'ubiquitine et des différentes chaînes engendrées ainsi que leur implication en physiologie animale.

Une activité E3 ligase impliquée dans la polyubiquitination en K6 a été décrite dans la formation du complexe formé du suppresseur de tumeur BRCA1 et de BARD1 mais sa fonction est inconnue (Wu-Baer et al. 2003). L'ubiquitination en K11 semble être impliquée dans la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique, alors que celle en K29 semble être impliquée dans la dégradation protéique lysosomale (Adhikari and Chen 2009). La polyubiquitination sur la lysine 48 (K48) cible typiquement les substrats à la dégradation par le protéasome 26S et est essentielle aux fonctions cellulaires puisque la surexpression d'une forme mutée de l'ubiquitine K48R dans les cellules est létale (Adhikari and Chen 2009). De façon générale, les substrats de cette modification sont les protéines aberrantes ou mal repliées qui interviennent dans la régulation de facteurs de transcription et de régulateurs du cycle cellulaire. Tandis que la poly-ubiquitination sur la lysine 63 (K63) est principalement impliquée dans des fonctions indépendantes du protéasome. Elle est largement décrite dans la formation de complexes protéiques impliqués dans la signalisation de survie cellulaire (NF-κB), la réparation de l'ADN, la transduction de signaux cellulaires, l'endocytose de récepteurs, l'inflammation, l'hématopoïèse ou la localisation cellulaire des protéines (Panier and Durocher 2009; Liu and Chen 2011).

La diversité des processus initiés suivant le type de liaison rencontré est le résultat de différentes conformations adoptées par les chaînes d'ubiquitines. En effet, la liaison en K48 engendre une conformation dite fermée tandis que celle engendrée par la K63 est dite conformation ouverte (Pickart and Fushman 2004).

Les rôles fonctionnels de l'ubiquitination et de la polyubiquitination sont dépendants de leur reconnaissance par des domaines de liaison à l'ubiquitine (UBDs). A ce jour, près d'une vingtaine de domaines de liaison sont connus dont ubiquitin interacting motifs (UIM), ubiquitin-association (UBA) et ubiquitin E2 variant (UEV). De plus, comme pour les processus de phosphorylation / déphosphorylation, l'ubiquitination est régulée physiologiquement grâce à l'intervention de plusieurs enzymes désubiquitylante (DUB). On répertorie dans la littérature près de 100 DUB (Skaug et al. 2009).

## **2. Pathologies associées au système d'ubiquitination**

L'ubiquitination est décrite pour être impliquée dans de nombreux processus cellulaires. De nombreuses pathologies sont actuellement décrites pour être associées à une dérégulation du système d'ubiquitination. On peut compter des pathologies telles que les cancers, les infections microbiennes, les maladies auto-immunes (diabète de type 2) ou encore les maladies neurodégénératives (Schmitt 2006). C'est pourquoi le bon fonctionnement de cette modification post-traductionnelle dans les voies de signalisations moléculaires est primordial afin d'assurer ses fonctions biologiques. Par exemple, ce processus est impliqué dans l'endocytose des récepteurs, et par conséquent dans la régulation de l'activation des voies de signalisation. En effet, lors de l'activation du récepteur à l'EGF (epidermal growth factor), la transphosphorylation des résidus tyrosines dans sa partie cytoplasmique induit le recrutement de protéines contenant des domaines SH2 dont la E3 Cbl (Casitas B-lineage lymphoma protooncogene). Cbl est responsable de la monoubiquitination de l'EGFR qui est par la suite reconnu par des protéines contenant un domaine UIM dont Epsin et EPS15 impliquées dans des phénomènes de remodelage membranaire et d'endocytose (Seet et al., 2006). Une dérégulation de ce processus cellulaire entraînerait une hyper activation de l'EGFR ce qui induirait une croissance cellulaire incontrôlée. La diversité des interactions existantes entre les E2 et les E3 ainsi que la formation des différentes chaînes de polyubiquitines possibles sur les protéines augmentent la complexité des recherches entreprises sur cette modification post-traductionnelle.

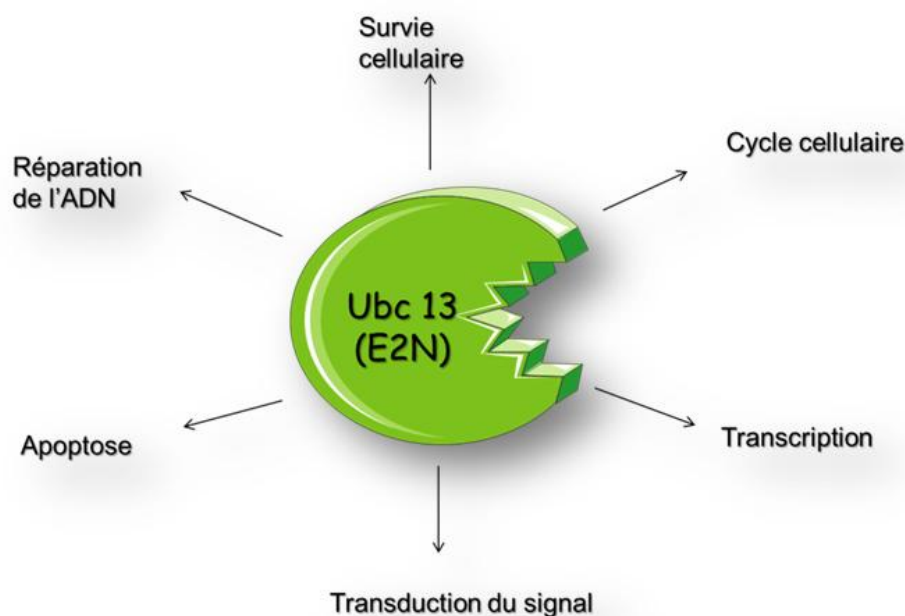
Ainsi, le rôle de l'ubiquitination dans le contrôle de la prolifération cellulaire en fait un candidat de choix dans l'étude de la cancérogénèse. Des études récentes montrent l'implication de l'ubiquitination dans la dégradation du suppresseur des tumeurs p53, un facteur de transcription qui se retrouve impliqué dans près de la moitié des cas de tumeurs observées. Dans une cellule normale en l'absence de tout stress, la liaison de la E3 ligase MDM2 à p53 induit sa dégradation par le protéasome (Petroski 2008). Ainsi, un déficit dans le processus menant à l'ubiquitination de p53 augmente sa stabilité et influence la régulation du cycle cellulaire. Cette modification est également utilisée par certains pathogènes afin de contourner le système immunitaire de l'hôte. Par exemple, suite à l'infection d'une cellule par le virus de l'herpès, celui-ci utilise la machinerie cellulaire de l'hôte pour induire la synthèse de deux ubiquitine ligases, K3 (MIR1) et K5 (MIR2). L'expression et l'activité de ces protéines entraînent une diminution de l'expression des récepteurs membranaires des cellules immunitaires de l'hôte. Par exemple, une récente étude montre l'implication des E2 Ubc13 et UbcH5b/c dans la diminution de l'expression des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe 1 par K3 (Petroski 2008).

Actuellement, le Velcade est le seul médicament mis sur le marché qui cible cette modification post-traductionnelle. Il s'agit d'un inhibiteur réversible de l'activité chymotrypsine du protéasome 26S utilisé dans le traitement contre les myélomes multiples (Nalepa et al. 2006). Ainsi, ce composé pharmacologique interfère au niveau de la dégradation des protéines polyubiquitinées en K48 via le protéasome. Une nouvelle drogue, la Nutlins, fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase I/II. Ce traitement est décrit pour interférer avec l'ubiquitination de p53 via MDM2 ce qui engendre l'apoptose des cellules tumorales (Petroski, 2008).

### **3. Caractéristiques d'Ubc13**

Comme décrit précédemment, les E2 sont impliquées dans la réaction intermédiaire du processus d'ubiquitination. Elles catalysent la réaction de transfert de l'ubiquitine à une E3 (HECT) ou directement sur le domaine RING d'une protéine cible. La E2, Ubc13, fait l'objet d'un intérêt grandissant depuis la dernière décennie. En effet, son rôle dans de nombreux processus physiologiques a été décrit, notamment dans la régulation du cycle cellulaire, dans la réaction inflammatoire et la réparation de l'ADN (figure 23).





**Figure 23:** principales fonctions physiologiques d'Ubc13. *Ubc13 est impliquée dans de nombreux processus physiologique tels que la mort par apoptose, la régulation de la transcription, le cycle cellulaire, la survie cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore la transduction de signaux cellulaires.*

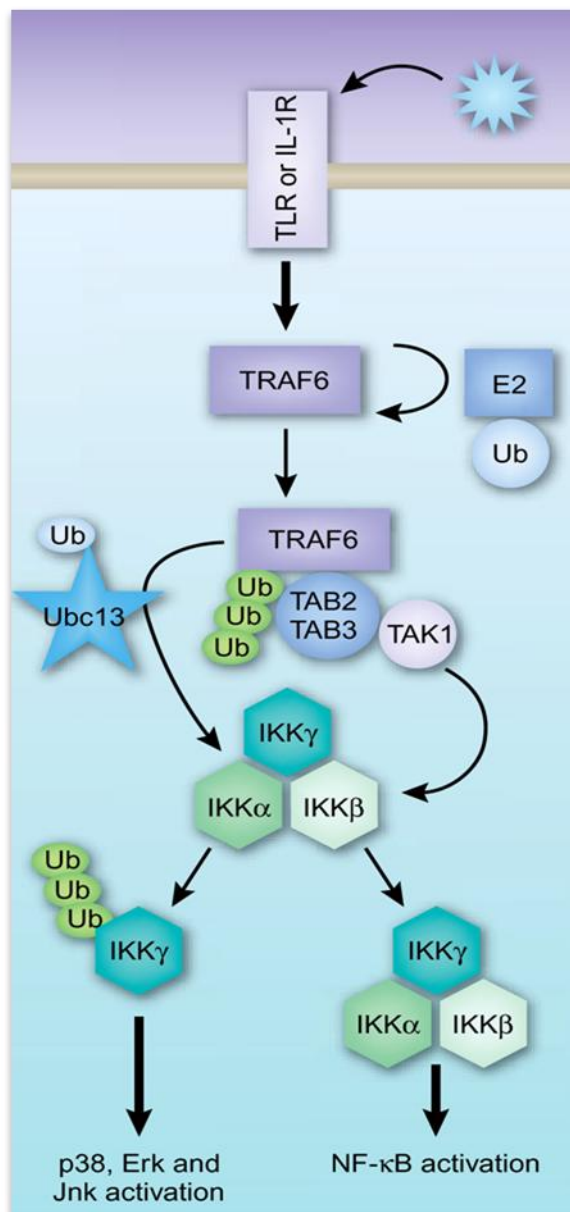
Pour être active, Ubc13 nécessite la présence de cofacteur enzymatique, nommés Ubc variants, dont la structure est similaire à la E2 mais ne possèdent pas de résidus Cys actif, responsable de l'activité enzymatique. Ainsi, ces cofacteurs ne peuvent pas catalyser par eux-mêmes la polyubiquitination en K63.

### 3.1 Régulation de l'activité d'Ubc13

A ce jour deux cofacteurs d'Ubc13 impliqués dans son activation sont décrits, MMS2 et Uev1A. Ces deux cofacteurs possèdent une homologie de structure de 90%. Ubc13 est la seule enzyme de la famille des E2 décrite pour être spécifique de la formation de chaînes de polyubiquitine en K63 dû à sa conformation adoptée lors de la liaison à son cofacteur permettant la liaison de la K63 de l'ubiquitine au niveau de la Cys du site actif. Cependant, Anderson et collaborateurs montrent que la réponse cellulaire engendrée est dépendante du complexe Ubc13-cofacteur (MMS2 ou Uev1A) impliqué dans l'élongation de la chaîne d'ubiquitine (Andersen et al. 2005). En effet, la liaison de MMS2 à Ubc13 semble être impliquée dans la réparation de l'ADN tandis que sa liaison à Uev1A serait impliquée dans

l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. D'autres travaux confirment l'implication d'Ubc13 dans la régulation du cycle cellulaire en modulant la localisation nucléaire de la protéine suppresseur de tumeur p53 (Topisirovic et al. 2009) et l'activation des MAP kinases (Yamamoto et al. 2006), (Laine et al. 2006).

Il a également été montré le rôle d'Ubc13 dans l'ubiquitination des protéines TRAF. En effet, l'ubiquitination des protéines TRAF est considérée comme important pour l'activation des voies de signalisation des MAPK et de NF-kappa B dépendante des récepteurs TNFR-, TLR-, IL-1R. Ubc13 est décrite pour jouer un rôle dans ces voies de signalisation. Toutefois, de nouvelles données indiquent que l'ubiquitination de TRAF6 et l'activation de NF-kappa B sont possibles même en l'absence d'Ubc13. En revanche, Ubc13 semble jouer un rôle important pour l'ubiquitination d'IKKgamma et l'activation des MAP kinases. Les



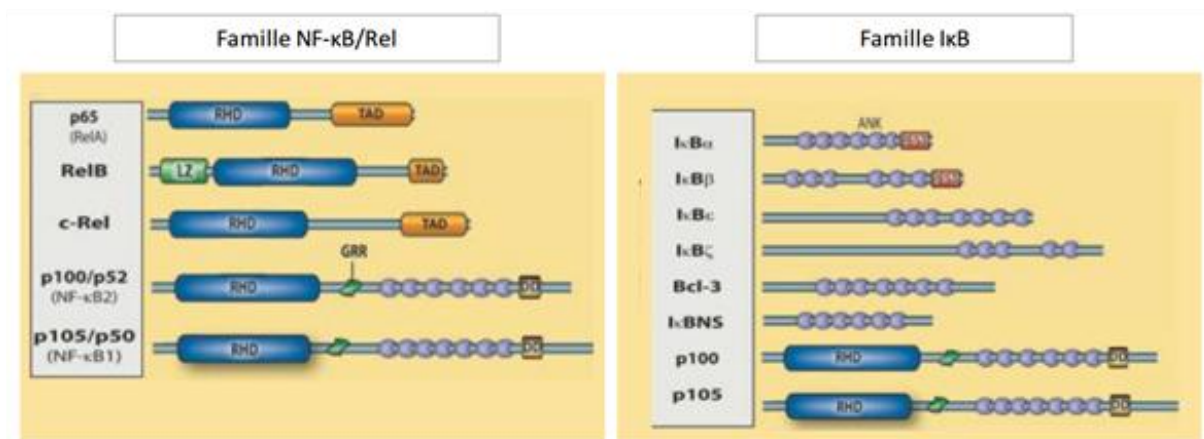
événements indépendants d'Ubc13 permettent l'activation de NF-kappa B malgré une réduction d'ubiquitination d'IKKgamma. Ainsi, l'activation d'IKKgamma peut se faire de façon Ubc13-dépendante et Ubc13 indépendante, ce qui active des voies de signalisation distinctes en aval (Figure 24).

**Figure 24:** ubiquitination de TRAF6 de façon dépendante et indépendante d'Ubc13. *Source :* (Ma and Turer 2006)

Les protéines cibles d'Ubc13 ne sont pas encore toutes connues et de nombreuses recherches restent à être réalisées afin de mieux comprendre son implication dans la survie cellulaire. Néanmoins son rôle dans les voies de signalisation dépendantes du facteur de transcription NF $\kappa$ B fait l'objet de nombreuses études (Andersen et al. 2005; Syed et al. 2006; Yamamoto et al. 2006).

### **3.2 Importance du facteur de transcription NF $\kappa$ B**

Le nom NF- $\kappa$ B est utilisé pour désigner un homo- ou hétérodimère de protéines de la famille Rel. Cette famille est très conservée au cours de l'évolution et comprend 5 protéines (p50, p52, p65 (ou RelA), c-Rel, et RelB) qui partagent en N-terminal un domaine d'homologie Rel, d'environ 300 acides aminés (Figure 25). Ce domaine d'homologie ou RHD (Rel Homology Domain) est responsable de la dimérisation de ces protéines, de leur interaction avec leurs inhibiteurs naturels de la famille I $\kappa$ B, et de leur liaison à l'ADN. Les protéines RelA (p65, NF- $\kappa$ B3), Rel (c-Rel) et RelB comprennent, en plus de leur domaine RHD, un ou plusieurs domaines d'activation transcriptionnelle TAD (Transcription Activation Domain) en C-terminal. Elles sont capables de former des homo- ou hétérodimères. Les protéines p50 (NF- $\kappa$ B1) et p52 (NF- $\kappa$ B2) sont produites sous forme de précurseurs, p105 et p100 respectivement, qui contiennent dans leur domaine C-terminal 5 à 7 répétitions d'un motif ankyrine inhibiteur. Ces protéines actives sont produites soit par arrêt de la traduction, soit par protéolyse limitée. Les protéines p50 et p52 ne contiennent pas de domaine TAD d'activation transcriptionnelle et doivent former des dimères avec p65, Rel ou Rel-B pour avoir une activité de facteur de transcription (Li and Stark 2002). L'expression des sous-unités p65 et p50 est ubiquitaire, alors que celle des autres protéines Rel est en général restreinte à des types cellulaires différenciés (Edwards et al. 2009). Ainsi, la combinaison dimérique la plus fréquemment rencontrée, et qui est généralement nommée NF- $\kappa$ B, est la combinaison p65/p50 (pour revue (Hayden et al. 2006; Hayden and Ghosh 2011). Physiologiquement, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est retrouvé activé dans l'homéostasie, notamment pour le renouvellement cellulaire. (Martinka and Bruggeman 2006)



**Figure 25:** les protéines de la famille Rel/ NFκB et leurs inhibiteurs naturels IκB chez le mammifère. D'après (Hayden and Ghosh 2011).

Le facteur de transcription NF-κB contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie, la réponse au stress, l'angiogenèse ou l'inflammation (Hacker and Karin 2006) (Hayden and Ghosh 2008). L'activité de NF-κB est largement régulée par de multiples voies de signalisation, et son activation anormale a été montrée liée au développement et à la progression de nombreux cancers (Staudt 2010). L'activation constitutive de NF-κB a été observée, par exemple, dans les lymphomes B non Hodgkinien avec plus de 90% des tumeurs présentant une localisation nucléaire de NF-κB, marque de son activation. (Honma et al. 2009). Un rôle important des sites de liaison à NFκB dans l'induction de l'activité promotrice de la NOS II a été rapporté notamment dans des cellules murines (Lorsbach et al. 1993; Goldring et al. 1996; Wu et al. 1998).

NFκB est présent dans le cytosol sous forme de complexe inactif IκB-NFκB. Ce complexe est phosphorylé par les IκB kinase (IKK) après une activation par des stimulateurs comme des LPS ou de l'IFN $\gamma$ , ce qui facilite la translocation de NFκB libre du cytosol au noyau et l'induction de l'expression du gène de la NOS II (Obermeier et al. 1999). Cette phosphorylation d'IκB et l'activation des protéines Rel peuvent se faire soit par la voie canonique ou classique, soit par la voie alternative (Figure 26). Ces deux voies se distinguent par les trimères d'IKK mis en jeu, et par conséquent par les dimères de NF-κB activés.

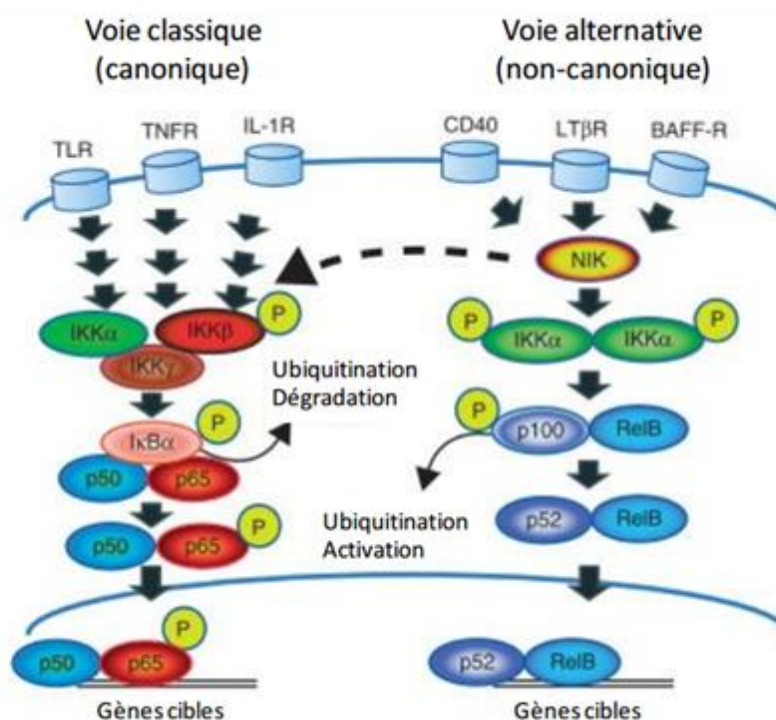
### *Voie classique*

La voie classique (voie canonique) est induite par de nombreux médiateurs de la réponse innée et adaptative tels que les cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), les TLRs, les récepteurs d'antigènes (TCR, BCR), et les LPS (lipopolysaccharides). La phosphorylation critique de I $\kappa$ B est créée par le complexe IKK (IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /NEMO), conduisant à sa dégradation complète par le protéasome (Karin 1999; Gilmore 2006). Le complexe NF- $\kappa$ B (p65/p50) est alors libéré de son inhibiteur I $\kappa$ B puis est transloqué du cytosol vers le noyau où il active ses gènes cibles. Un des gènes cibles de NF- $\kappa$ B est I $\kappa$ B $\alpha$ . I $\kappa$ B $\alpha$  néo-synthétisé migre alors dans le noyau pour se lier à NF- $\kappa$ B, le complexe I $\kappa$ B $\alpha$  /NF- $\kappa$ B migre ensuite vers le cytoplasme grâce au signal d'export nucléaire de I $\kappa$ B $\alpha$  (Hayden and Ghosh 2011). Dans la voie classique, IKK $\beta$  est nécessaire et suffisant pour phosphoryler I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32 et Ser36) et I $\kappa$ B $\beta$  (Ser19, Ser23) (Hatada et al. 2000).

### *Voie alternative*

La voie alternative (voie non canonique), dite « indépendante de NEMO », joue un rôle important dans le développement et l'homéostasie des organes lymphoïdes secondaires et dans l'immunité adaptative. En effet, suite à des stimuli, tels que la fixation du ligand de CD40, BAFF (B-cell Activating Factor), ou de la lymphotoxine  $\beta$ , la protéine kinase NIK (Nck Interacting Kinase) est activée et phosphoryle l'homodimère IKK $\alpha$ . IKK $\alpha$  phosphoryle à son tour le précurseur p100 qui est ensuite ubiquitiné par le complexe SCF et partiellement dégradé par le protéasome libérant ainsi des complexes fonctionnels de type p52/RelB et p52/RelA. Enfin, ces complexes sont redirigés vers le noyau pour activer la transcription des gènes de la réponse  $\kappa$ B (Weil and Israel 2006).

En dehors de ces deux voies, il existe d'autres systèmes activant NF- $\kappa$ B de façon indépendantes des IKK. Ces systèmes font notamment intervenir la voie des MAP Kinase en particulier la p38 MAP kinases (Ben-Neriah and Schmitz 2004; Gilmore 2006). Il a également été décrit que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) augmente la dégradation d'I $\kappa$ B, activant ainsi la voie NF $\kappa$ B et induisant l'expression de la NOS II dans des macrophages (Bowie and O'Neill 2000). La lactacystine ou le MG-132 empêche l'induction de la NOS II en bloquant la dégradation de I $\kappa$ B (Musial and Eissa 2001), confirmant l'importance de NF $\kappa$ B dans la régulation de la production de NO par la NOS II.



**Figure 26:** les principales voies de signalisation de NFκB. D'après (Sakamoto and Maeda 2010).

Ainsi, compte tenu de l'implication dans les voies de signalisation qui convergent à l'activation de NF-κB et compte tenu de la fonction *in vivo* d'Ubc13, le potentiel de cibler cette enzyme E2 et ses protéines cibles dans notre modèle est proposé.

On peut conclure qu'à travers les différentes études décrites plus haut que l'augmentation du taux et de la durée de la production du NO joue un rôle primordial dans la régulation des processus carcinogènes. L'altération du statut redox et les modifications du pattern transcriptionnel induit par le NO dans les cellules cancéreuses augmente la mort cellulaire et exerce des propriétés antinéoplasiques. Dans ce sens, plus de travaux devraient être conduits dans le but d'identifier les conditions temporelles, spatiales, et les concentrations de la production du NO qui exerceraient le maximum d'activité anti-tumorale aussi bien pour une utilisation comme monothérapie ou combiné à des traitements chimio-thérapeutiques.

## CADRE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Chez la femme, le cancer du sein représente la moitié des cas de cancers enregistrés ces 25 dernières années (Lévêque et al., 2008). Ce cancer touche près de 46 000 femmes chaque année en France et est responsable de 12 000 décès par an. Les traitements de référence sont : la chirurgie, la radiothérapie locorégionale et / ou la curiethérapie qui complètent le geste chirurgical, soit en amont, soit en aval, et enfin, la chimiothérapie qui est utilisée seule ou associée à la chirurgie. Malgré tous ces traitements, des métastases se développent, d'abord au niveau pulmonaires puis osseux et enfin plus généralisées, d'où la nécessité de mettre au point de nouveaux traitements (Morris et al., 2009).

Depuis plusieurs années, nos travaux portent sur la sensibilisation à la mort de différents types de cellules cancéreuses par le monoxyde d'azote ou NO. Le NO peut-être endogène, c'est-à-dire produit par les NO synthases (NOS) des cellules ou il peut être exogène, apporter par des donneurs de NO. Chez l'homme, il est connu qu'une des trois NOS, la NOS inductible ou NOS II peut être exprimée dans les cancers de la tête et du cou, de l'ovaire, du colon ainsi que dans les cancers du poumon et du sein. Notre équipe a ainsi montré que dans le cancer du sein, les tumeurs qui expriment le plus la NOS II sont celles dont les cellules tumorales prolifèrent le moins et dont le grade est le plus bas (Onier et al., 1999).

Dans l'équipe nous utilisons un lipide A de synthèse, l'OM-174 (OM Pharma, Genève) qui entre autres activités induit la production de monoxyde d'azote (NO). Depuis quelques années, notre groupe étudie l'activité antitumorale de l'OM-174, notamment dans un modèle de cancer colique chez le rat (Onier et al. 1999).

Les cellules cancéreuses coliques PROb injectées à des rats BDIX syngéniques induisent des carcinomatoses péritonéales à tous les animaux. Sans traitement tous les rats meurent de leurs tumeurs en 6 à 7 semaines. Un traitement par l'OM-174 guérit 90 à 100 % des rats porteurs de carcinomatoses (Onier et al., 1999). Nous avons également montré l'activité antitumorale de l'OM-174 dans un modèle de mélanome B16 (Gautier et al, 2010).

**L'objectif de mon travail de thèse a donc été de valider l'activité antitumorale du lipide A dans un modèle de cancer mammaire chez la souris et d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de cet effet.**

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché dans un premier temps, à valider l'activité anti-tumorale du lipide A dans un modèle de cancer mammaire murin syngénique de la souris Balb/c utilisant la lignée EMT-6H. Ce clone a été obtenu dans notre laboratoire par dilution limite à partir de la lignée mère EMT-6 et sélectionné sur la base de la faible réponse à l'IL-1 $\beta$ , en terme d'expression de la NOS II et de la tumorigénicité. Ce clone répond faiblement à l'IL-1 $\beta$ , un activateur de la NOS II, et est fortement tumorigène (Gauthier et al, 2004).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les mécanismes moléculaires responsables de l'activité antitumorale du lipide A, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'étude des mécanismes impliqués nous a conduits à nous intéresser au rôle des Toll-like receptors (TLR) en l'occurrence le TLR4 (récepteur du lipide A) et de la NOS II dans cet effet. Une collaboration a été mise en place avec l'équipe de Jean-Luc Boucher (Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601, Université Paris Descartes) pour analyser le rôle des facteurs influençant l'activité des NOS II. Nous nous sommes également intéressés à l'implication des modifications post-traductionnelles des protéines



induites par le NO telles que la S-nitrosylation (fixation d'un radical NO sur un résidu cystéine spécifique d'une protéine).

Pour cela, un des objectifs du travail, à savoir l'identification de protéines S-nitrosylées par le NO, a été réalisée en collaboration avec la plateforme protéomique CLIPP de l'université de Bourgogne.

## CHAPITRE II : RESULTATS

### **Présentation de l'article : le découplage enzymatique de la NO synthase inductible dans les cellules tumorales induit la production de péroxynitrites qui module la mort induite par un agoniste de TLR4.**

Dans notre laboratoire, il a été montré qu'un analogue de lipide A : l'OM-174 était pourvu d'une activité anti-tumorale dans un modèle de cancer colique chez le rats BDIX (Onier et al. 1999). La régression tumorale observée a été corrélée à l'expression de la NOS II et à la production de NO<sup>•</sup> dans les tumeurs. Un effet anti-tumoral de ce lipide A a également été observé dans un modèle de cancer mammaire chez la souris ; les cellules cancéreuses mammaires EMT-6H injectées dans la veine caudale de souris Balb/c allant induire la formation de nodules pulmonaires.

Dans ce modèle l'effet anti-tumoral du lipide A est dépendant du NO produit par les cellules tumorales. Ceci a été montré en utilisant des souris Balb/c déficientes pour le gène de la NOS II, chez qui le traitement est aussi efficace que chez les souris sauvages. De plus, l'injection d'un inhibiteur spécifique de la NOS II qui ne peut agir que sur les cellules tumorales inhibe l'efficacité du traitement.

A ce stade des travaux du laboratoire deux hypothèses prévalent :

- un effet indirect du lipide A sur la mort cellulaire passant par les cellules TLR4+ de la souris.
- un effet indirect associé à un effet direct du lipide A sur les cellules tumorales.

Nous avons donc décidé d'étudier ces hypothèses. Pour ce faire, nous avons utilisé différentes approches *in vitro* et *in vivo*.

Ainsi dans ce travail, nous montrons que le lipide A n'induit pas seul l'expression de la NOS II et la production de NO<sup>•</sup> par les cellules EMT-6H et il n'est pas toxique pour les

cellules. Il est connu que les cytokines induisant l'expression de la NOS II et la production de NO<sup>•</sup> sont l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$ . Il est également connu que pour activer la cytotoxicité des macrophages il faut associer LPS et IFN $\gamma$ . Nous avons donc testé la combinaison lipide A/IFN $\gamma$ . L'IFN $\gamma$  seul n'a pas d'effet sur l'expression de la NOS II, la production de NO<sup>•</sup> ni d'effet cytotoxique. Par contre la combinaison lipide A/IFN $\gamma$  induit l'expression de la NOS II, la production de NO<sup>•</sup> et une cytotoxicité. L'IFN $\gamma$  apparaît donc comme un médiateur de la réponse anti-tumoral du lipide A. Nous nous sommes demandé si l'IFN $\gamma$  agit directement sur les cellules tumorales. Ainsi, l'inhibition de l'expression du récepteur 2 à l'IFN $\gamma$  (IFNR2) annule l'efficacité du lipide A *in vivo* mais également *in vitro* puisque les cellules mutées ne sont alors plus capable d'induire l'expression de la NOS II, ni de produire de NO en réponse au lipide A. Ces résultats laissent penser que la production de NO<sup>•</sup> des cellules tumorales est cytotoxique.

Cependant, il a été montré que le NO<sup>•</sup> à la concentration produite par la NOS II, donnant 20 à 40  $\mu$ M de nitrites, n'est pas cytotoxique. Par contre il sensibilise les cellules EMT-6H à l'effet de Fas-L. Il est donc possible que l'IFN $\gamma$  agisse en augmentant la production de NO et/ou en induisant la production d'un second facteur cytotoxique en présence de NO<sup>•</sup>.

Les recherches en cours dans le laboratoire nous ont conduits à chercher la production de ROS. En effet, il est connu que le NO<sup>•</sup> en présence d'anions superoxydes donne des peroxynitrites fortement cytotoxiques (Pacher et al., 2007). Nous montrons que ni le lipide A, ni l'IFN $\gamma$  seuls n'induisent de production de ROS contrairement à la combinaison lipide A/IFN $\gamma$ . Nous avons également montré que seuls, le lipide A et l'IFN $\gamma$  n'induisent pas la production de peroxynitrites contrairement à leur combinaison. Puis nous avons montré que ces peroxynitrites sont cytotoxiques puisque leur élimination inhibe l'effet cytotoxique de la combinaison lipide A/IFN $\gamma$ .

Nous avons donc montré que l'effet toxique de l'association lipide A/IFN $\gamma$  est dû à la production de NO<sup>•</sup> et O<sub>2</sub><sup>-</sup> dont la présence simultanée provoquerait la production de peroxynitrites dont nous avons vérifié la formation et la cytotoxicité.

Ces résultats posent la question de savoir qui produit les O<sub>2</sub><sup>-</sup> sous l'effet de la combinaison lipide A/IFN $\gamma$ . Nous avons suivi deux voies pour répondre à cette question. La première a consisté à inhiber de façon spécifique la NOS II et les résultats montrent qu'une

telle inhibition annule la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La seconde voie consiste à inhiber les autres enzymes de la cellule capable de produire des O<sub>2</sub><sup>-</sup>, nous avons abandonné cette voie car les résultats étaient peu reproductibles.

La question de la mise en place de ce mécanisme d'action *in vivo* se pose alors. Pour répondre à cette question, nous avons mis en évidence que le lipide A agit sur les cellules EMT-6H par l'intermédiaire des récepteurs au lipide A, le TLR4. Nous avons cherché à empêcher l'expression de TLR4 par les cellules EMT-6H de façon stable pour injecter les cellules génétiquement modifiées *in vivo* et vérifier l'effet anti-tumoral de l'OM-174. Nous avons eu recours à des stratégies d'ARN interférence (siRNA et shRNA) afin d'éteindre l'expression de TLR4 à la surface des cellules EMT-6H. Nous avons obtenu des clones cellulaires se comportant comme un dominant négatif pour TLR4 qui n'exprime plus la NOS II et ne produit plus de NO<sup>•</sup> en réponse à la combinaison lipide A/IFN $\gamma$ . Ces clones ont donc été injectés dans des souris Balb/c pour tester l'inefficacité du traitement par lipide A. Cette première expérience nous a permis de montrer que l'efficacité du traitement par le lipide A *in vivo* est dépendante d'un TLR4 intact à la surface des cellules tumorales.

Le fait de montrer que les cellules EMT-6H n'exprimant plus le récepteur TLR4, ne répondent plus au lipide A laisse penser que le lipide A agit *in vivo* directement sur les cellules tumorales. Nous avons vérifié cette hypothèse en mesurant la présence du lipide A par le dosage du  $\beta$ -hydroxymyristate au sein des nodules pulmonaires de souris traitées par le lipide A et confirmons la présence de ce résidu lipidique. Le  $\beta$ -hydroxymyristate est un constituant spécifique des bactéries à Gram négative et du lipide A. Nous confirmons également par immuno-histochimie la fixation du lipide A sur les cellules tumorales à l'aide d'un anticorps dirigé contre ce lipide A. Si ce dernier atteint les nodules pulmonaires et agit directement sur les cellules tumorales en association avec l'IFN $\gamma$  dont il aura induit la production par les cellules TLR4+ de la souris, nous devrions obtenir dans les cellules tumorales *in vivo* l'expression de la NOS II, la production de NO<sup>•</sup>, d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et de peroxynitrites. La production de peroxynitrites a également été vérifiée en cherchant la formation de protéines nitrosées dans les tumeurs. Une augmentation de la présence de O<sub>2</sub><sup>-</sup> sur des coupes de poumons de souris traitées par le lipide A a également été obtenue en comparaison à celles de souris traitées par du sérum physiologique.

Après avoir montré que c'est bien la NOS II qui induit la production de NO<sup>•</sup> et O<sub>2</sub><sup>-</sup>, nous avons étudié la question du mécanisme. En effet, on sait qu'en milieu acellulaire, les

NOS produisent du NO<sup>•</sup> en présence de leurs cofacteurs tel que BH4 et leur substrat, L-arginine (Alderton et al., 2001). Il a été montré qu'en absence de BH4 et/ou de L-arginine, elles produisent des O2<sup>•-</sup>. Il a également été montré, en milieu acellulaire, que les NOS peuvent produire du NO<sup>•</sup> et des O2<sup>•-</sup> mais ceci n'est pas connu, *in vivo*, dans les cellules tumorales. Il faudrait supposer que la combinaison lipide A/IFN $\gamma$  induise une diminution de L-arginine en diminuant la disponibilité du cofacteur BH4. Ainsi nous montrons par HPLC une diminution de la quantité d'arginine dans des lysats cellulaire traités par la combinaison contrairement à des lysats non traités. Un premier dosage de la disponibilité du cofacteur enzymatique BH4 ne révèle aucune différence. Nous montrons également que cette diminution n'est pas due à la dégradation de la L-arginine par l'arginase puisque lorsqu'on mesure son activité, elle reste inchangée suivant les différents traitements.

Ainsi, ces travaux montrent que l'analogue de lipide A présente un effet antitumoral dû à la production d'IFN  $\gamma$  par les cellules du système immunitaire dans un modèle de tumeurs mammaires chez la souris. Cet effet nécessite l'expression des récepteurs TLR4 et IFNR2 à la surface des cellules tumorales. L'association de l'ALA et l'IFN  $\gamma$  entraîne le découplage enzymatique de la NOS II qui produit alors à la fois du monoxyde d'azote et des anions superoxydes. Ces deux entités réagissent ensemble pour former peroxynitrites responsables de la mort des cellules tumorales et de l'effet anti-tumoral observé *in vivo*.

# Uncoupled inducible nitric oxide synthase in tumor cells produces peroxynitrite to mediate the antitumoral response induced by TLR4 agonist

*Article soumis dans la revue Cancer Cell.*

Myriam Lamrani<sup>a</sup>, Nejia Sassi<sup>a</sup>, Catherine Paul, Nolwenn Gauthier, Jean-Luc Boucher<sup>b</sup>, Jérôme Labbé, Cédric Seignez, Cindy Racœur, Anne Athias<sup>c</sup>, Romain Guerreiro<sup>d</sup>, Catherine Vergely<sup>c</sup>, Luc Rochette<sup>c</sup>, Ali Bettaieb, Jean-François Jeannin<sup>e</sup>

EA 7269 Ecole Pratique des Hautes Etudes-Université de Bourgogne, INSERM U 866, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon France

<sup>a</sup> equal contribution to the manuscript

<sup>b</sup> UMR Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR 8601 CNRS, University Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, 75270 Paris, France.

<sup>c</sup> INSERM U 866, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon France.

<sup>d</sup> BioGéoSciences UMR 6282, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon France.

<sup>e</sup> corresponding author

Contact: [jean-francois.jeannin@u-bourgogne.fr](mailto:jean-francois.jeannin@u-bourgogne.fr), fax: 33 3 80 39 34 34

Running title: TLR4 as death receptor

## SUMMARY

An analog of lipid A (ALA) exhibited an antitumor effect due to IFN $\gamma$  production in a model of mice mammary tumors. This effect required TLR4 and IFNR2 in tumor cells. The association of ALA and IFN $\gamma$  uncoupled NOSII activity so it produced both NO and superoxides that reacted together to form peroxynitrites responsible for the tumor cell death and antitumor effect *in vivo*.

## SIGNIFICANCE

It is hypothesized that immunotherapy with BCG or ALA consists in providing tumor antigens, activating antigen-presenting cells and contributing to a favorable microenvironment for development of an adaptive immune response. We show *in vitro* and *in vivo* how TLR4 activation by ALA kills tumor cells which is the first step in antigen supply, and induces tumor regression. This study reveals the involvement of NOSII uncoupling in tumor cell death and immunotherapy. Therefore, TLR4 is not only a danger-associated molecular patterns receptor in immune cells but also a receptor of death in tumor cells.

## HIGHLIGHTS

ALA *in vivo* induces the production of IFN $\gamma$ .

ALA and IFN $\gamma$  together cause NOSII uncoupling in tumor cells *in vitro* and *in vivo*.

Uncoupled NOSII in tumor cells produces NO and O $_2^-$  that form cytotoxic peroxynitrites.

Peroxyntirites produced by uncoupled NOSII cause tumor regression.

## INTRODUCTION

To achieve a full antitumor immune response, T cells have to be stimulated by their T cell receptor after antigen recognition, to be co-stimulated by their co-receptors like CD28, and to be in a suitable microenvironment. Dead tumor cells release tumor antigens and danger-associated molecular patterns (DAMP) which activate antigen presentation in dendritic cells (DC) that is required for the development of adaptive immune response. For more than 30 years the standard treatment for superficial bladder cancer has been Bacillus Calmette and Guérin (BCG) immunotherapy (Herr et al. 1995; Sylvester et al. 2002). BCG induces tumor cell death by activating natural killer (NK) cells, stimulates Toll-like receptors (TLR) in a similar manner to DAMP stimulation, and creates local inflammation that favors antigen presentation and type 1 maturation of T cells. Other microbial molecules acting in the same way might be effective in immunotherapy. For example, lipopolysaccharides (LPS) are able to activate NK-mediated tumor cell death (Conti et al. 1991), activate DC (Yang et al. 2012) and induce an inflammatory microenvironment suitable for an immune response (Pollara et al. 2006).

The discovery of this three-faceted mode of action brings up to date Coley's pioneering work with bacterial toxins in cancer therapy (Coley 1910). The toxins were identified as the LPS of the outer membrane of Gram negative bacteria and confirmed to display antitumor activities in several animal models of cancer (Strausser and Bober 1972; Parr et al. 1973; Lagadec et al. 1987). The lipid part of LPS, lipid A, can alone produce the same antitumor effects as the whole molecule *in vivo* and *in vitro* (Parr et al. 1973; Takayama et al. 1981; Galanos et al. 1985; Jeannin et al. 1991). LPS and natural lipid A are too toxic to be used in human therapy and one of the major recent advances in this field has been the synthesis of analogs of lipid A (ALA) that are biologically active and well tolerated in patients with cancer (Kiani et al. 1997; de Bono et al. 2000; Isambert et al. 2013).

Another major advance was the discovery that the LPS and lipid A receptor is Toll-like receptor (TLR) 4 (Qureshi et al. 1999; Takeuchi et al. 1999). Three of the four TLR agonists authorized for use in human cancer therapy are TLR4 agonists. BCG is used against superficial bladder cancers (Lamm et al. 1981), monophosphoryl lipid A is used against cervical cancers (Dubensky and Reed 2010) and Picibanil is used in Japan against cervical and gastric cancers (Kikkawa et al. 1993; Maehara et al. 1994). Although these molecules were all used before their receptor was identified, the potential of TLR agonists in cancer



therapy is now being considered reviewed in (Galluzzi et al. 2012). ALA are promising candidates although their antitumor mechanisms are not well understood, especially *in vivo*. Whether ALA kill tumor cells to provide dendritic cells with antigen is not known. Some ALA are able to induce NOSII activity, this enzyme catalyses the transformation of arginine into citrulline and nitric oxide (NO). Its activity is generally regulated at the transcriptional level and induced by inflammatory cytokines in immune cells but also a large range of tumor cells reviewed in (Fitzpatrick et al. 2008). We have shown that NO produced *in vitro* in tumor cells is able to sensitize them to death effectors as cytokines (Leon-Bollotte et al. 2011). We present here a comprehensive picture of tumor cell death induction by an ALA *in vivo* and *in vitro* in a mammary tumor model in mice and we show the implication of TLR4 as death receptor and the involvement of NOSII uncoupling in the antitumor effect.

## RESULTS

### 1. An ALA had an *in vivo* antitumor effect depending on host TLR4<sup>+</sup> cells and tumor cell NOSII

We reported previously that the ALA OM-174 had an antitumor effect in melanoma in mice (subcutaneous tumors) and in a model of colon cancer in rat (peritoneal carcinomatosis) (Onier et al. 1999; Gautier et al. 2010). We show here that the same ALA was effective in a model of breast cancer in mice in which breast carcinoma EMT-6H cells injected in Balb/c mice cause lung tumor nodules. When treated with ALA, 50 to 75 % of tumor-bearing mice were alive 35 days after tumor cell injection, while all the mice treated with saline solution alone died before day 35 (Fig. 1a).

TLR4 associates with myeloid differentiation 2 (MD2) to form the cell receptor of lipid A, so we tested whether ALA was effective in mice lacking TLR4. Wild-type (wt) mice treated with ALA survived significantly longer than untreated mice or TLR4<sup>-/-</sup> mice. ALA was ineffective in TLR4<sup>-/-</sup> mice (Fig 1a). This showed that the antitumor effect of ALA was mediated by TLR4<sup>+</sup> cells of mice.

We previously showed that NO production in tumors was related to the antitumoral effect of ALA (Onier et al. 1999). We therefore tested the effect of ALA in mice lacking NOSII. We had also previously demonstrated and confirmed again here that NOSII of host cells facilitates tumor growth as 40% of NOSII<sup>-/-</sup> mice were still alive 35 days after tumor cell injection while all the wt mice injected with EMT-6H cells died within 35 days (Gauthier

et al. 2004). Furthermore NOSII<sup>-/-</sup> mice treated with ALA survived significantly longer than NOSII<sup>-/-</sup> control mice (Fig. 1b). We deduced that ALA efficacy did not involve the NOSII of host cells. To test this hypothesis further we treated NOSII<sup>-/-</sup> mice with ALA and aminoguanidine (AG), an *in vivo* inhibitor of NOSII (Griffiths et al. 1993; Joly et al. 1994). AG inhibited ALA efficacy (Fig. 1b). We concluded that, in this model, the NOSII produced by tumor cells was involved in the antitumor effect of ALA.

## 2. IFN $\gamma$ mediated the ALA antitumor effect and had a direct effect *in vivo* on tumor cells

To explain how TLR4<sup>+</sup> cells of the host and NOSII of tumor cells were involved in the antitumor effect of ALA, we hypothesized that ALA activated TLR4<sup>+</sup> cells to produce cytokine (s) able to induce NOSII activity in tumor cells and hence tumor cell death. In a semi-quantitative cytokine array assay, the blood of tumor-bearing mice treated with ALA was found to contain three times as much IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  as blood from control mice that did not receive ALA. These two cytokines are known to activate NOSII in most tumor cells. IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  alone or in association failed to activate NOSII in EMT-6H cells *in vitro* and did not have any cytotoxic effect (Fig. S1). TNF $\alpha$  + ALA had no toxic effect either. However, IFN $\gamma$  + ALA had a toxic effect (Fig. S1) and induced NOS II expression (Fig. 2a). The death of cells was dependent on NOSII activity as AG and 1400W, both inhibitors of NOS II activity, reduced the toxic effect of IFN $\gamma$  + ALA (Fig. 2 b).

Therefore we assumed that ALA activated TLR4<sup>+</sup> cells *in vivo* to produce IFN $\gamma$  and that ALA and IFN $\gamma$  together had a toxic effect mediated by the NOSII activity of tumor cells. We tested this hypothesis using IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice. Wt tumor-bearing mice treated with ALA survived longer than untreated mice or mutant mice but no difference in survival rates was found between IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice treated with or without ALA. The number of tumor-bearing mice treated with ALA that were still alive on day 35 was significantly lower in IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice than in wt mice (Fig. 2c). We thus concluded that the IFN $\gamma$  produced by the host was involved in the antitumor effect of ALA. However the involvement of IFN $\gamma$  *in vivo* does not imply that IFN $\gamma$  has a direct effect on tumor cells. We therefore inhibited the expression of the IFN $\gamma$  receptor 2 (IFNR2) in EMT-6H cells by shRNA. Most of the IFNR2 sh-clones grew more slowly than EMT-6H *in vitro* and grew heterogeneously *in vivo*. ALA + IFN $\gamma$  induced much less expression of NOSII in clones A and B than in wt cells (Fig. S2).

Both sh IFNR2 clones produced less NO when treated with ALA + IFN $\gamma$  and were less cytotoxic than wt cells (Fig. 2d). When cells of sh IFNR2 clones were injected into wt mice, mice injected with clone B lived longer than those injected with clone A, but ALA did not significantly alter mouse survival in either case (Fig. 2e). The loss of the ALA effect when tumor cells are less receptive to IFN $\gamma$  therefore suggests that IFN $\gamma$  was necessary for the effectiveness of ALA in this model by acting directly on tumor cells.

### 3. ALA binding to tumor cell TLR4 was involved in its antitumor effect *in vitro* and *in vivo*

It is possible that ALA acts on TLR4<sup>+</sup> cells of the host and induces the production of IFN $\gamma$  and/or that ALA has a direct effect on tumor cells themselves. Could ALA efficacy be due to ALA binding tumor cells? A series of three *in vitro* experiments were carried out to answer this question. 1) Using flow cytometry EMT-6H cells were found to express TLR4/md2 at their surface (Fig. 3a). 2) Antagonists of TLR4/MD2 reduced NOSII expression (Fig. 3b) and NO production (Fig. 3c) in the presence of ALA + IFN $\gamma$ . 3) IFN $\gamma$  alone or ALA alone had no cytotoxic effect on EMT-6H cells but the combination of both compounds had a strong cytotoxic effect (Fig. S1 and Fig. 2b).

To investigate whether ALA might act directly on tumor cells *in vivo*,  $\beta$ -hydroxymyristic acid, a specific component of ALA (Maitra et al. 1978), was measured in various organs of mice.  $\beta$ -hydroxymyristic acid was not detected in the lungs of untreated healthy mice (data not shown) or in the lungs or nodules of mice treated with saline solution. On the contrary, the concentration of  $\beta$ -hydroxymyristic acid was significantly higher in tumor nodules and lung tissue of ALA-treated mice. In these mice,  $\beta$ -hydroxymyristic acid was also found in the liver and at very low concentrations in muscles (Fig. 4a). It was confirmed by immunohistochemistry that ALA indeed reached the tumor nodules and bound tumor cells *in vivo*. Figure 4b (top panel) shows the detection of TLR4 and ALA inside tumor nodules from ALA-treated mice. Quadruple staining (Fig. 4b, bottom panel) shows that tumor cells, i.e. those that expressed cytokeratin 19, expressed TLR4 and bound ALA.

To determine whether a direct effect of ALA on tumor cells was involved in its antitumor effect *in vivo*, we downregulated the expression of TLR4 in EMT-6H cells using shRNA. Most TLR4 sh-clones grew more slowly than EMT-6H cells *in vitro* and grew heterogeneously *in vivo*. In sh TLR4 clones 1 and 2, the magnitude of the NOSII expression

(Fig. S3), NO production and cytotoxicity responses to ALA + IFN $\gamma$  induction was reduced (Fig 4c). ALA treatment did not alter the survival rate of wt mice injected with sh TLR4 clones 1 and 2. Downregulating TLR4 therefore led to loss of the ALA effect whether mice survived as long as or longer than usual (Fig. 4d).

We concluded that ALA had a direct effect on tumor cells *in vivo* and that tumor cell TLR4 is involved in the antitumor effect of ALA.

#### 4. The antitumor effect of ALA plus IFN $\gamma$ involved induction of ROS production

Our results showed that TLR4<sup>+</sup> cells of the host activated by ALA produced IFN $\gamma$ , and that ALA + IFN $\gamma$  were involved in the antitumor effect by acting directly on tumor cells. These data led us to search for the mechanisms that induce tumor cell death (see Supplementary Experimental Procedures for details of all inhibitors, donors and probes used). Neither ALA alone nor IFN $\gamma$  alone were toxic for EMT-6H cells, but the ALA and IFN $\gamma$  association was cytotoxic. In the presence of ALA + IFN $\gamma$ , more cells survived when NOSII activity was inhibited with AG or 1400W than in the absence of inhibitors (Fig. 2b). Constitutive NOS I and NOSIII were not found to be expressed in EMT-6H cells and AG and 1400W selectively inhibit NOSII activity (Joly et al. 1994; Garvey et al. 1997; Lee et al. 2012), so we deduced that the activation of NOSII was involved in the cytotoxicity (Fig. 5a). To test the NO role, EMT-6H cells were pretreated with CPTIO, an NO scavenger, before adding ALA + IFN $\gamma$ . Under these conditions, cytotoxicity decreased threefold (Fig. 5b). The intracellular NO donor GTN at 30-40  $\mu$ M produced the same amount of nitrite as NOSII, but was not toxic to EMT-6H cells (Fig. 5c). Furthermore, different NO donors, such as SNAP and SNP, when delivered at concentrations that produced the same amount of nitrite as NOSII did, were not cytotoxic even in the presence of IFN $\gamma$  (Fig. 5d). Therefore NO produced by NOSII seemed necessary but not sufficient to induce cytotoxicity, implying that another mediator was required to act with NO.

Reactive oxygen species (ROS) were a candidate cytotoxic agent. As shown in Figure 6a, the combination of ALA and IFN $\gamma$  induced ROS production in EMT-6H cells as detected by flow cytometry with a ROS-sensitive probe, DHE. Addition of the NOS inhibitor 1400W to the cells abolished the increase in ROS production (Fig.6a). These results were confirmed using another ROS probe, DCFH<sub>2</sub>-DA (data not shown), and using the CMH probe, which reacts with a superoxide ion to produce a nitroxide radical that can be detected by electron

paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy (Fig.6b). Detection of ROS in cryo-sections of lungs and tumor nodules with the DHE probe showed an increase in ROS in ALA treated mice (Fig.6c). Inhibition of NOSII activity reduced this ROS production whatever inhibitor was used, whether 1400W (Fig. 6a and b), AG, NMMA or NAME (data not shown). We concluded that ALA + IFN $\gamma$  induced NO and ROS production in EMT-6H cells via NOSII activity. Some mice were given N-acetyl cysteine (NAC), a ROS inhibitor, in their drinking water. ALA-treated mice survived longer without NAC than with it and longer than untreated mice either with or without NAC (Fig. 6d). As NAC reduced the antitumor activity of ALA, ROS production likely has an antitumor effect *in vivo*.

#### 5 – The toxic effect of ALA plus IFN $\gamma$ on EMT-6H cells was due to peroxynitrite

NO and superoxide are known to react together to give rise to highly cytotoxic peroxynitrite. We thus searched for evidence of peroxynitrite formation in the mouse cells as detected by luminescence in the presence of luminol. The association of ALA and IFN $\gamma$  had a potent effect on the luminescence produced in EMT-6H cells (Fig. 7a and b), whereas IFN $\gamma$  alone increased the luminescence slightly and ALA alone had no effect (not shown). *In vivo* the production of peroxynitrites in tumors from ALA-treated mice was assessed using tumor sections and anti-NO-tyrosine antibodies (Fig. 7c). When 1400W or FeTPPS, a catalyst for the degradation of peroxynitrites (Misko et al. 1998), were added to EMT-6H cells treated with ALA + IFN $\gamma$ , less luminescence was detected (Fig. 7a and b) and the cytotoxicity of ALA + IFN $\gamma$  was inhibited (Fig. 2a and 7d). An active role of peroxynitrite was further confirmed by demonstrating that SIN-1, a peroxynitrite donor (Mohr et al. 1994), induced cytotoxicity when added to EMT-6H cells (Fig. S4).

#### 6 - ALA plus IFN $\gamma$ induced uncoupling of NOSII activity to produce NO plus superoxide ion

NADPH oxidases (Nox) are the main enzymes that catalyze the production of superoxide by cells. However, the inhibition of Nox with various inhibitors did not decrease ALA+IFN $\gamma$  cytotoxicity (Fig. 8a) showing that Nox were not involved in the ALA+IFN $\gamma$  antitumor effect.

As expected, EMT-6H cells did not produce nitrites when treated with ALA + IFN $\gamma$  and NOSII inhibitors (Fig 8b). Interestingly 1400W (Fig. 6a, b), like AG (data not shown), also suppressed the ROS and superoxide accumulation in tumor cells. These data led us to consider whether NOSII itself was producing the ROS. In the absence of the substrate L-Arg

purified recombinant NOSII becomes uncoupled from the oxidation of NADPH resulting in prominent superoxide synthesis (Sun et al. 2010). NOSII uncoupling is regulated not only by the availability of L-Arg but also by the availability of the co-factor tetrahydrobiopterin (H<sub>4</sub>B). Modifying the amounts of H<sub>4</sub>B and L-Arg, particularly decreasing the L-Arg concentration, can lead to the generation of superoxide ions and hydrogen peroxide by NOSII (Xia et al. 1998). We therefore measured the concentrations of H<sub>4</sub>B and L-Arg in EMT-6H cells treated with ALA + IFN $\gamma$ . The amounts of H<sub>4</sub>B in EMT-6H cells were not significantly different from those of control cells (data not shown). By contrast, the amounts of L-Arg decreased as much as threefold in treated cells compared to untreated cells (Fig. 8c). We thus conclude that the reduced availability of L-Arg causes NOSII uncoupling in EMT-6H cells treated with ALA + IFN $\gamma$  and that under conditions NOSII of EMT-6H cells produces both NO and ROS.

## DISCUSSION

We have shown that ALA *in vivo* induced the production of IFN $\gamma$ , that ALA and IFN $\gamma$  together caused NOSII uncoupling in tumor cells *in vitro* and *in vivo*, and NOSII in tumor cells produced NO and superoxide that formed cytotoxic peroxynitrites. The peroxynitrites produced are responsible for the ALA antitumor effect.

ALA had an antitumor effect in NOSII<sup>-/-</sup> mice but not in NOSII<sup>-/-</sup> mice treated with AG, an inhibitor of NOSII effective *in vivo* (Griffiths et al. 1993; Joly et al. 1994), so in the absence of host NOSII, AG can only be inhibiting the NOSII of tumor cells. Therefore tumor cell NOSII but not host NOSII are necessary for the antitumor activity of ALA. The extent to which NO either facilitates or prevents tumor growth is the subject of ardent debate undoubtedly fueled by the currently limited knowledge of NO physiopathology. For example, we were the first to show that NO produced by rat spleen macrophages has an immunosuppressive effect facilitating tumor growth (Lejeune et al. 1994). However, at the same time and in the same model of colon cancer in rat we showed that the tumor regression induced by ALA was associated with NO production in tumor cells (Onier et al. 1999). In the mouse mammary tumor model used for the experiments presented here we previously showed that host NOSII facilitated tumor growth (Gauthier et al. 2004). Now we show that tumor cell NOSII is involved in the antitumor effect of ALA, but not host NOSII. In these studies, when the cytotoxic effect of NO was directed against spleen lymphocytes, tumor growth was facilitated, but when it was directed against tumor cells, tumor growth was inhibited.

Therefore, the effects of NO not only depend on its concentration and its redox microenvironment, but also on the NO-producing cells and the target cells, all of which are key points to consider in developing therapeutic strategies.

In most cells, the Nox family of NADPH oxidases are the primary sources of superoxide and IFN $\gamma$  is able to activate Nox in epithelial tumor cells to produce ROS (Wu et al. 2011). Attempts to inhibit ROS production with specific inhibitors of Nox had no effect on ALA + IFN $\gamma$  cytotoxicity showing that the superoxide reacting with NO was not produced by Nox. Moreover NO produced by NOSII can migrate through the cell, but when NOSII produces both NO and superoxide peroxynitrites form immediately so it is unlikely that NO was available to diffuse through the cell and react with any superoxide produced by Nox. It is also possible that NO inhibits Nox activities since it is known that Nox2, Nox1, Nox3 and Nox5 activities are inhibited by nitrosylation (Selemidis et al. 2007; Qian et al. 2012).

In the presence of physiological concentrations of L-Arg, NOSII expressed in macrophages does not produce much superoxide. However, NOSII has been shown to produce NO and superoxide when L-Arg was depleted in these cells (Xia and Zweier 1997). In our model, the production of superoxide by NOSII could be linked to the decrease in the intracellular concentration of L-Arg following ALA+IFN $\gamma$  treatment that did not significantly affect the intracellular concentration of H<sub>4</sub>B.

The observed decrease in L-Arg concentration could be due to L-Arg transformation by NOS or arginases (ARG1 and ARG2), or possibly arginine decarboxylase and arginine glycine amidinotransferase (Wu and Morris 1998). We did not find appreciable changes in ARG activity between control and ALA + IFN $\gamma$  treated cells (data not shown). This is not surprising since ARG1 is not induced by Th1 cytokines (IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) but by Th2 cytokines (IL-4, IL-10, IL-13), which were not present *in vitro* in our experiments (Corraliza et al. 1995; Hesse et al. 2001). ARG 2 is not modulated by any of these Th1 cytokines (Munder et al. 1999; Rodriguez et al. 2003). Thus ARG are probably not involved in Arg consumption. Arg is a semi-essential amino acid taken up from plasma and therefore from food (or the culture medium). Arg is transported into cells via a family of proteins called cationic amino acid transporters (CAT). Inflammatory cytokines and LPS can induce CAT activity. Consequently, they can co-activate L-Arg uptake and NOSII activity in normal rodent cells (Hattori et al. 1994; Simmons et al. 1996; Nicholson et al. 2001).

However, it is possible that LPS and IFN $\gamma$  together induce NOSII activity but not L-Arg uptake (Gill et al. 1996) as IFN $\gamma$  could inhibit ARG1 activated by Th2 cytokines (Hesse et al. 2001). In our model, LPS + IFN $\gamma$  induced NOSII activity and transient uptake of L-Arg reached a maximum at 8h returning to basal activity after 24 h. NO is usually produced for 48 h after LPS + IFN $\gamma$  addition (Cendan et al. 1996). Similar kinetics have been reported with LPS + IFN $\gamma$  in normal cells (Bogle et al. 1992; Hattori et al. 1999). It is therefore convincing that L-Arg uptake by CAT was no more active when NOSII was fully activated, leading to a decrease in intracellular L-Arg concentration.

ALA, like BCG, is used here as an adjuvant of the antitumor immune response. By activating TLR4, ALA should induce an adaptive immune response because TLR4 (and INFR2) activation kills tumor cells and provides antigens and TLR4 controls tumor antigen processing and presentation (Apetoh et al. 2007). Indeed treatment with ALA led to immunization in a rat model of cancer (Onier et al. 1999). In this model too, mice cured of EMT-6H tumors with ALA were protected against grafts of other EMT-6 cells from various clones but not against 4T1 cell grafts (syngeneic of Balb/c mice) (data not shown). So ALA induces an adaptive immune response against either an antigen common to EMT-6 cells and/or to several antigens specific to each clone of EMT-6 cells. In any case, by activating TLR4 *in situ*, ALA induces a range of adaptive immune responses which are likely to be extended when ALA administration is repeated. Because activating TLR4 and IFNR2 induces tumor cell death, TLR4 is not only a DAMP receptor in immune cells but also a death receptor in tumor cells.



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

Full details of experimental procedures are given in Supplemental Experimental Procedures.

### Cells, animals and immunotherapy

Mammary EMT-6 tumor cells were grown as monolayers at 37°C in medium supplemented with 10% fetal calf serum free of LPS.

EMT-6H tumor cells were injected intravenously (i.v.) into Balb/c mice giving rise to lung tumor nodules that killed the mice within 5 weeks. Treatment consisted in 5 i.v. injections of the lipid A analog OM-174 (OM PHARMA, Meyrin, Switzerland). AG, an inhibitor of NOSII, was injected i.p., whereas NAC, a ROS inhibitor, was given in drinking water. On day 35, any surviving mice were euthanized and autopsied.

### Procedures

*Immunoblot analysis.* After stimulation as appropriate, EMT-6H cells were scraped from the culture vessel surface, and proteins were extracted with RIPA buffer containing protease inhibitors. The protein concentration was measured using a protein assay kit. Proteins (30-50 µg) were incubated with loading buffer, separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane. Immunoblots were incubated with a specific primary antibody, followed by a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and were developed by the enhanced chemiluminescence method according to the manufacturer's instructions.

*Immunohistofluorescence.* Tumor nodules were harvested from lungs, fixed with formalin, embedded in paraffin and sectioned. After blocking nonspecific sites slides were incubated with different primary antibodies then with secondary antibodies coupled with Alexa Fluor 568, 488 or 647. To determine whether peroxynitrites were formed *in vivo*, slides were incubated with a biotin-conjugated antibody then with a peroxidase-conjugated streptavidin secondary antibody. Full details of antibodies and microscopy are given in Supplemental Information.

*Measurement of live cell density.* EMT-6H cells were seeded into a 96-well plate for 24 h, treated with or without 500 ng/ml ALA, 33 ng/ml IFN $\gamma$ , or 10  $\mu$ M GTN and incubated for 48 h. The density of live cells was determined in a methylene blue colorimetric test (Olsson et al. 1982; Jeannin et al. 1991).

*Flow cytometry.* Cells were incubated with anti-TLR4/MD2 monoclonal antibody then with an Alexa Fluor 488-coupled secondary antibody. Fluorescence was analyzed using a FACScan flow cytometer.

*Determination of NO production.* NO production was estimated by using the Griess microassay to determine nitrite accumulation in the cell culture media (Green et al. 1982).

*Measurement of ROS.* The intracellular production of ROS was measured using the oxidation of dehydroethydine (DHE) to its fluorescent derivatives. Tumor cells were incubated with the DHE probe in the dark. DHE fluorescence was measured with a FACScan flow cytometer.

In some experiments, generation of ROS was probed by measuring the electron paramagnetic resonance of CMH using a spectrometer. The results from the various assays were normalized to the number of cells used in the experiment.

*Peroxynitrite detection.* Formation of peroxynitrite was detected by adding luminol to cells and using a luminometer.

*Measurement of L-Arg concentration.* Amino acids from cell extracts were derivatized and separated by reverse-phase high pressure liquid chromatography (HPLC) with homo-L-Arg used as an internal standard. Detection was performed at 420 nm.

*Lipid A quantitation.* Organs from mice were collected and immediately stored in liquid nitrogen. Samples were ground and the amounts of ALA were determined by direct quantitation of  $\beta$ -hydroxymyristic acid in the extracts by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Parlesak and Bode 1995).

*Analysis of biopterin in cell supernatants.* Biopterin levels were measured by reverse-phase HPLC after oxidation. Amounts of H<sub>4</sub>B were calculated from the difference in biopterin concentrations measured after oxidation in acid (total biopterins) and base (H<sub>2</sub>B + biopterin) (Heller et al. 2001).

*Statistics.* Unless otherwise stated in the figure legends data from one experiment representative of three experiments are shown. *In vitro* data are presented as the mean  $\pm$  SD and paired groups were compared with the Student's *t* test. *In vivo* survival data were plotted by computing the Kaplan-Meier estimators which can be used to analyze observations for which the complete distribution is not known (i.e., censored data). Cox proportional-hazards regressions were performed to test for differences among *in vivo* groups.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Valérie Saint-Giorgio for her expert technical assistance. This work was supported by a grant FEDER 2009-0431SGO003S01173 from European Union and n°32403 from Regional Council of Burgundy and grants from Ligue contre le cancer (CCIR-GE, 90X.2009), Fondation de France (2011-00020354) and INCA (686/08). ML was supported by a doctoral fellowship from Fondation de la Recherche Médicale and CS by a doctoral fellowship from Regional Council of Burgundy and from Ligue Nationale Contre le Cancer.

The authors have declared no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M. C., Ullrich, E., Saulnier, P., *et al.* (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine* 13, 1050-1059.
- Bogle, R. G., Baydoun, A. R., Pearson, J. D., Moncada, S., and Mann, G. E. (1992). L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. *The Biochemical journal* 284 ( Pt 1), 15-18.
- Cendan, J. C., Topping, D. L., Pruitt, J., Snowdy, S., Copeland, E. M., 3rd, and Lind, D. S. (1996). Inflammatory mediators stimulate arginine transport and arginine-derived nitric oxide production in a murine breast cancer cell line. *The Journal of surgical research* 60, 284-288.
- Coley, W. B. (1910). The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med* 3, 1-48.
- Conti, P., Dempsey, R. A., Reale, M., Barbacane, R. C., Panara, M. R., Bongrazio, M., and Mier, J. W. (1991). Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta, tumour necrosis factor and interleukin-6. Effect of IL-1 receptor antagonist. *Immunology* 73, 450-456.
- Corraliza, I. M., Soler, G., Eichmann, K., and Modolell, M. (1995). Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 206, 667-673.
- de Bono, J. S., Dalglish, A. G., Carmichael, J., Diffley, J., Lofts, F. J., Fyffe, D., Ellard, S., Gordon, R. J., Brindley, C. J., and Evans, T. R. (2000). Phase I study of ONO-4007, a synthetic analogue of the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharide. *Clin Cancer Res* 6, 397-405.
- Dubensky, T. W., Jr., and Reed, S. G. (2010). Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in immunology* 22, 155-161.
- Fitzpatrick, B., Mehibel, M., Cowen, R. L., and Stratford, I. J. (2008). iNOS as a therapeutic target for treatment of human tumors. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 19, 217-224.
- Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E. T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M., Schade, U., Imoto, M., Yoshimura, H., and *et al.* (1985). Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem* 148, 1-5.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W. H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 1, 699-716.
- Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J., and Knowles, R. G. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 272, 4959-4963.

- Gauthier, N., Lohm, S., Touzery, C., Chantome, A., Perette, B., Reveneau, S., Brunotte, F., Juillerat-Jeanneret, L., and Jeannin, J. F. (2004). Tumour-derived and host-derived nitric oxide differentially regulate breast carcinoma metastasis to the lungs. *Carcinogenesis* 25, 1559-1565.
- Gautier, T., Paul, C., Deckert, V., Desrumaux, C., Klein, A., Labbe, J., Le Guern, N., Athias, A., Monier, S., Hammann, A., *et al.* (2010). Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J* 24, 3544-3554.
- Gill, D. J., Low, B. C., and Grigor, M. R. (1996). Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate the cat-2 gene of the L-arginine transporter in cultured vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 11280-11283.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry* 126, 131-138.
- Griffiths, M. J., Messent, M., MacAllister, R. J., and Evans, T. W. (1993). Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *British journal of pharmacology* 110, 963-968.
- Hattori, Y., Campbell, E. B., and Gross, S. S. (1994). Argininosuccinate synthetase mRNA and activity are induced by immunostimulants in vascular smooth muscle. Role in the regeneration or arginine for nitric oxide synthesis. *The Journal of biological chemistry* 269, 9405-9408.
- Hattori, Y., Kasai, K., and Gross, S. S. (1999). Cationic amino acid transporter gene expression in cultured vascular smooth muscle cells and in rats. *The American journal of physiology* 276, H2020-2028.
- Heller, R., Unbehaun, A., Schellenberg, B., Mayer, B., Werner-Felmayer, G., and Werner, E. R. (2001). L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *The Journal of biological chemistry* 276, 40-47.
- Herr, H. W., Schwalb, D. M., Zhang, Z. F., Sogani, P. C., Fair, W. R., Whitmore, W. F., Jr., and Oettgen, H. F. (1995). Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 13, 1404-1408.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., Pearce, E. J., and Wynn, T. A. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 167, 6533-6544.
- Isambert, N., Fumoleau, P., Paul, C., Ferrand, C., Zanetta, S., Bauer, J., Ragot, K., Lizard, G., Jeannin, J. F., and Bardou, M. (2013). Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer* 13, 172.
- Jeannin, J. F., Onier, N., Lagadec, P., von Jeney, N., Stutz, P., and Liehl, E. (1991). Antitumor effect of synthetic derivatives of lipid A in an experimental model of colon cancer in the rat. *Gastroenterology* 101, 726-733.
- Joly, G. A., Ayres, M., Chelly, F., and Kilbourn, R. G. (1994). Effects of NG-methyl-L-arginine, NG-nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *Biochemical and biophysical research communications* 199, 147-154.

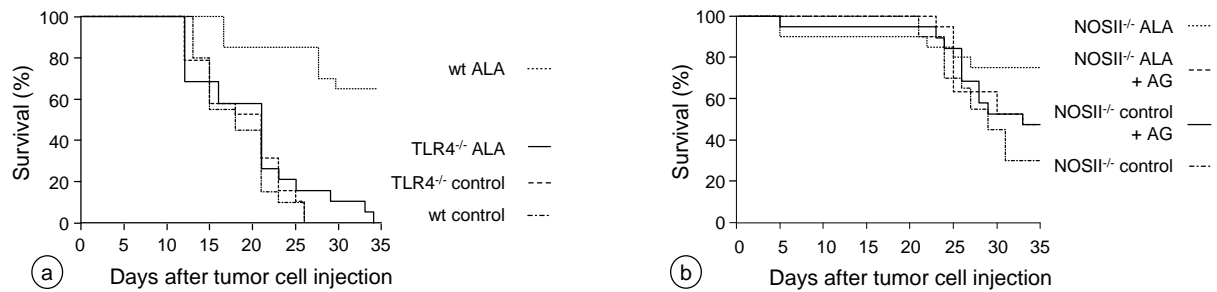
- Kiani, A., Tschiersch, A., Gaboriau, E., Otto, F., Seiz, A., Knopf, H. P., Stutz, P., Farber, L., Haus, U., Galanos, C., *et al.* (1997). Downregulation of the proinflammatory cytokine response to endotoxin by pretreatment with the nontoxic lipid A analog SDZ MRL 953 in cancer patients. *Blood* *90*, 1673-1683.
- Kikkawa, F., Kawai, M., Oguchi, H., Kojima, M., Ishikawa, H., Iwata, M., Maeda, O., Tomoda, Y., Arii, Y., Kuzuya, K., and *et al.* (1993). Randomised study of immunotherapy with OK-432 in uterine cervical carcinoma. *Eur J Cancer* *29A*, 1542-1546.
- Lagadec, P., Jeannin, J. F., Reisser, D., Pelletier, H., and Olsson, O. (1987). Treatment with endotoxins of peritoneal carcinomatosis induced by colon tumor cells in the rat. *Invasion Metastasis* *7*, 83-95.
- Lamm, D. L., Thor, D. E., Winters, W. D., Stogdill, V. D., and Radwin, H. M. (1981). BCG immunotherapy of bladder cancer: inhibition of tumor recurrence and associated immune responses. *Cancer* *48*, 82-88.
- Lee, K. S., Lee, D. K., Jeoung, D., Lee, H., Choe, J., Ha, K. S., Won, M. H., Kwon, Y. G., and Kim, Y. M. (2012). Differential effects of substrate-analogue inhibitors on nitric oxide synthase dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* *418*, 49-55.
- Lejeune, P., Lagadec, P., Onier, N., Pinard, D., Ohshima, H., and Jeannin, J. F. (1994). Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J Immunol* *152*, 5077-5083.
- Leon-Bollotte, L., Subramaniam, S., Cauvard, O., Plenchette-Colas, S., Paul, C., Godard, C., Martinez-Ruiz, A., Legembre, P., Jeannin, J. F., and Bettaieb, A. (2011). S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology* *140*, 2009-2018, 2018 e2001-2004.
- Maehara, Y., Okuyama, T., Kakeji, Y., Baba, H., Furusawa, M., and Sugimachi, K. (1994). Postoperative immunochemotherapy including streptococcal lysate OK-432 is effective for patients with gastric cancer and serosal invasion. *American journal of surgery* *168*, 36-40.
- Maitra, S. K., Schotz, M. C., Yoshikawa, T. T., and Guze, L. B. (1978). Determination of lipid A and endotoxin in serum by mass spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 3993-3997.
- Misko, T. P., Highkin, M. K., Veenhuizen, A. W., Manning, P. T., Stern, M. K., Currie, M. G., and Salvemini, D. (1998). Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *The Journal of biological chemistry* *273*, 15646-15653.
- Mohr, S., Stamler, J. S., and Brune, B. (1994). Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents. *FEBS letters* *348*, 223-227.
- Munder, M., Eichmann, K., Moran, J. M., Centeno, F., Soler, G., and Modolell, M. (1999). Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* *163*, 3771-3777.
- Nicholson, B., Manner, C. K., Kleeman, J., and MacLeod, C. L. (2001). Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *The Journal of biological chemistry* *276*, 15881-15885.

- Olsson, N. O., Leclerc, A., Jeannin, J. F., and Martin, F. (1982). A simple photometric microassay for the quantitative evaluation of macrophage-mediated cytotoxicity on adherent cancer cells. *Annales d'immunologie 133D*, 245-254.
- Onier, N., Hilpert, S., Arnould, L., Saint-Giorgio, V., Davies, J. G., and Jeannin, J. F. (1999a). Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats. *Clinical & experimental metastasis 17*, 299-306.
- Onier, N., Hilpert, S., Reveneau, S., Arnould, L., Saint-Giorgio, V., Exbrayat, J. M., and Jeannin, J. F. (1999b). Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats. *International journal of cancer Journal international du cancer 81*, 755-760.
- Parlesak, A., and Bode, C. (1995). Lipopolysaccharide determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography after fluorescence labeling. *Journal of chromatography A 711*, 277-288.
- Parr, I., Wheeler, E., and Alexander, P. (1973). Similarities of the anti-tumour actions of endotoxin, lipid A and double-stranded RNA. *Br J Cancer 27*, 370-389.
- Pollara, G., Handley, M. E., Kwan, A., Chain, B. M., and Katz, D. R. (2006). Autocrine type I interferon amplifies dendritic cell responses to lipopolysaccharide via the nuclear factor-kappaB/p38 pathways. *Scand J Immunol 63*, 151-154.
- Qian, J., Chen, F., Kovalenkov, Y., Pandey, D., Moseley, M. A., Foster, M. W., Black, S. M., Venema, R. C., Stepp, D. W., and Fulton, D. J. (2012). Nitric oxide reduces NADPH oxidase 5 (Nox5) activity by reversible S-nitrosylation. *Free radical biology & medicine 52*, 1806-1819.
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *The Journal of experimental medicine 189*, 615-625.
- Rodriguez, P. C., Zea, A. H., DeSalvo, J., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Quiceno, D. G., Ochoa, J. B., and Ochoa, A. C. (2003). L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol 171*, 1232-1239.
- Selemidis, S., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Kemp-Harper, B. K., and Drummond, G. R. (2007). Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovascular research 75*, 349-358.
- Simmons, W. W., Ungureanu-Longrois, D., Smith, G. K., Smith, T. W., and Kelly, R. A. (1996). Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport. *The Journal of biological chemistry 271*, 23928-23937.
- Strausser, H. R., and Bober, L. A. (1972). Inhibition of tumor growth and survival of aged mice inoculated with Moloney tumor transplants and treated with endotoxin. *Cancer Res 32*, 2156-2159.
- Sun, J., Druhan, L. J., and Zweier, J. L. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. *Archives of biochemistry and biophysics 494*, 130-137.

- Sylvester, R. J., van der, M. A., and Lamm, D. L. (2002). Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 168, 1964-1970.
- Takayama, K., Ribi, E., and Cantrell, J. L. (1981). Isolation of a nontoxic lipid A fraction containing tumor regression activity. *Cancer Res* 41, 2654-2657.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451.
- Wu, G., and Morris, S. M., Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal* 336 ( Pt 1), 1-17.
- Wu, Y., Antony, S., Juhasz, A., Lu, J., Ge, Y., Jiang, G., Roy, K., and Doroshow, J. H. (2011). Up-regulation and sustained activation of Stat1 are essential for interferon-gamma (IFN-gamma)-induced dual oxidase 2 (Duox2) and dual oxidase A2 (DuoxA2) expression in human pancreatic cancer cell lines. *The Journal of biological chemistry* 286, 12245-12256.
- Xia, Y., Roman, L. J., Masters, B. S., and Zweier, J. L. (1998). Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *The Journal of biological chemistry* 273, 22635-22639.
- Xia, Y., and Zweier, J. L. (1997). Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6954-6958.
- Yang, D., Postnikov, Y. V., Li, Y., Tewary, P., de la Rosa, G., Wei, F., Klinman, D., Gioannini, T., Weiss, J. P., Furusawa, T., *et al.* (2012). High-mobility group nucleosome-binding protein 1 acts as an alarmin and is critical for lipopolysaccharide-induced immune responses. *The Journal of experimental medicine* 209, 157-171.



## FIGURES

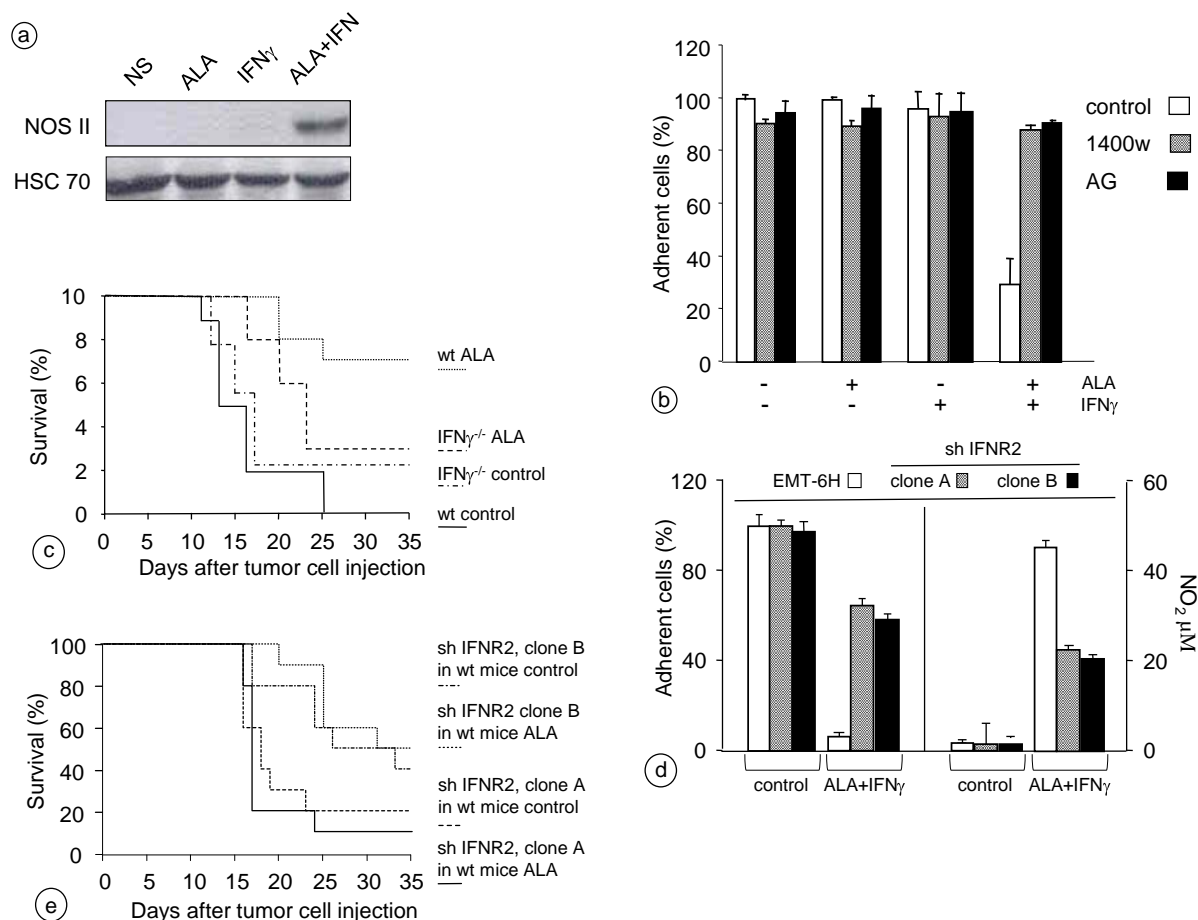


**Figure 1.** An ALA had an *in vivo* antitumor effect depending on host TLR4<sup>+</sup> cells and tumor cell NOSII.

Mice received EMT-6H cells on day 0. ALA was injected at the dose of 8 mg/kg in the caudal vein every 5 days from day 5 till day 25. Surviving mice were killed on day 35. See Supplementary Experimental Procedures for details.

a) Cumulative data of 2 independent experiments are shown with wild-type mice (wt) or mice with the TLR4 gene knocked-out (TLR4<sup>-/-</sup>), 20 mice per group. Group effect (Logrank test score = 39.98,  $P < 0.001$ ). Wt mice treated with ALA survived significantly longer than mice from other groups (post-hoc contrast test,  $z = -3.64$ ,  $P < 0.001$ ). ALA was ineffective in TLR4<sup>-/-</sup> mice.

b) Mice with the NOSII gene knocked-out (NOSII<sup>-/-</sup>) were injected with or without ALA and AG (50 mg/kg i.p.). Cumulative data of 2 independent experiments are shown, 20 mice per group. There was an overall treatment effect by the end of the experiment (analysis of deviance,  $F = 2.76$ ;  $p = 0.048$ ), with NOSII<sup>-/-</sup> mice treated with ALA surviving significantly longer than NOSII<sup>-/-</sup> mice treated differently (post-hoc contrast test,  $z = -2.05$ ,  $P = 0.04$ ). ALA increased the number of mice alive on day 35 in KO mice (NOSII<sup>-/-</sup> with ALA versus control NOSII<sup>-/-</sup>) but not in KO mice treated with AG (NOSII<sup>-/-</sup> with ALA + AG versus control NOSII<sup>-/-</sup> with AG).



**Figure 2.** IFN $\gamma$  mediated the ALA antitumor effect and had a direct effect in vivo on tumor cells.

a) EMT-6H cells did not express NOSII either spontaneously or when treated with ALA (500 ng/ml) or IFN $\gamma$  (33 ng/ml), but when treated with ALA and IFN $\gamma$ , NOSII protein accumulated in cells. One immunoblot representative of five experiments is shown.

b) EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h and treated with ALA (500 ng/ml) and/or IFN $\gamma$  (33 ng/ml)

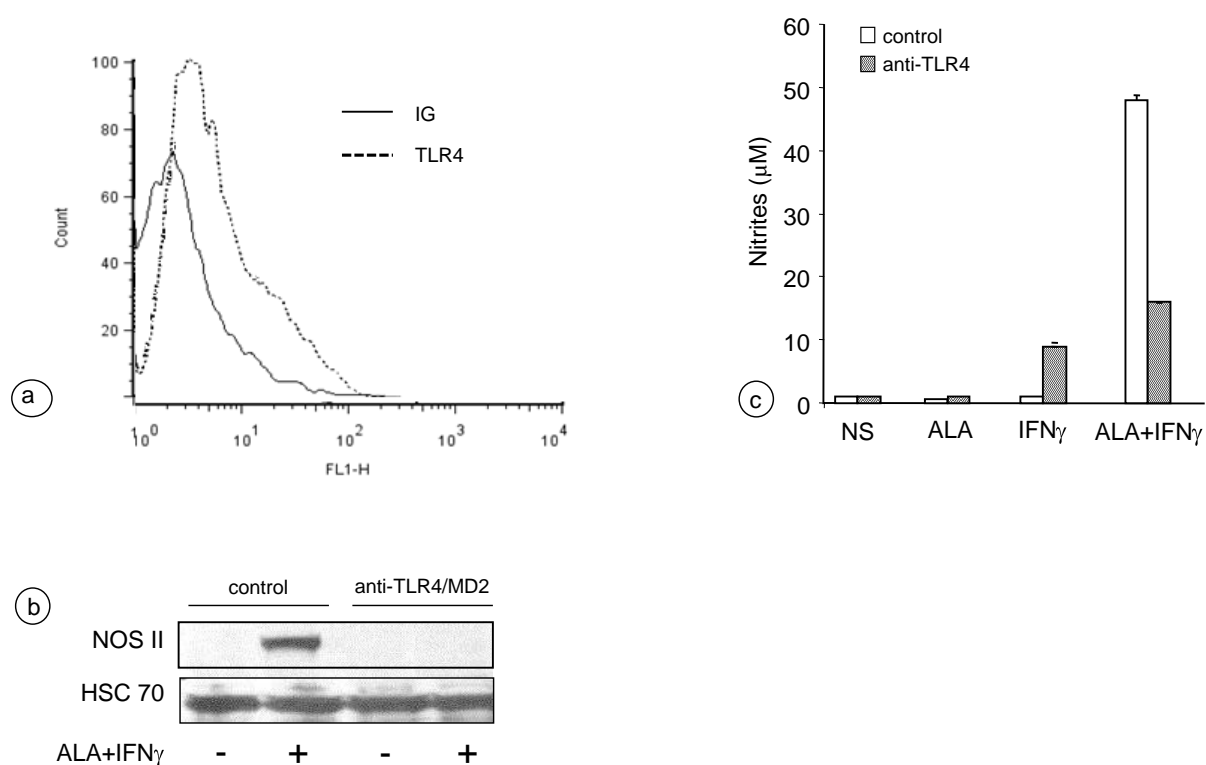
or not for 48 h. Live cell density was determined by a methylene blue test. The cytotoxicity of ALA plus IFN $\gamma$  ( $p < 0.005$ ) was totally inhibited by 0.5  $\mu$ M AG or 10  $\mu$ M 1400w. Data are from one experiment representative of five experiments.

c) Wild-type (wt) mice or mice with the IFN $\gamma$  gene knocked out (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>) were treated with ALA or not (control). Mice were treated as described in Figure 1. There was a group effect on

survival (log-rank test score =18.23;  $P < 0.001$ ). The ALA-treated wt group (wt ALA) survived longer than other groups (post-hoc contrast test,  $z = -2.34$ ;  $P = 0.019$ ) but there was no difference between IFN<sup>-/-</sup> mice treated or not treated with ALA (post-hoc contrast test,  $z = -1.51$ ;  $p = 0.13$ ).

d) EMT-6H wt or mutated cells (from clone A or clone B) in which IFNR2 expression was downregulated (with shRNA) were treated with ALA (500 ng/ml) plus IFN $\gamma$  (33 ng/ml). Live cell density was determined with a methylene blue test. Nitrite concentration in culture medium was measured using the Griess technique. ALA + IFN $\gamma$  added to wt cells were cytotoxic ( $p < 0.005$ ), left panel, and induced significantly more nitrite accumulation ( $p < 0.005$ ), right panel, that was significantly reduced in IFNR2 deficient cells ( $p < 0.05$ ).

e) Mice were treated as is described in Figure 1. There was a group effect on survival (log-rank test score =13.17;  $P < 0.01$ ). Survival of clone A mice was significantly shorter than for clone B mice (post-hoc contrast test,  $z = -3.29$ ,  $P = 0.001$ ) but no survival difference was found within clone A groups (mice treated or not treated with ALA ; post-hoc contrast test,  $z = 0.78$ ;  $P = 0.43$ ) nor within clone B groups (post-hoc contrast test,  $z = -0.54$ ,  $P = 0.59$ ). Data from two experiments representative of four are shown.

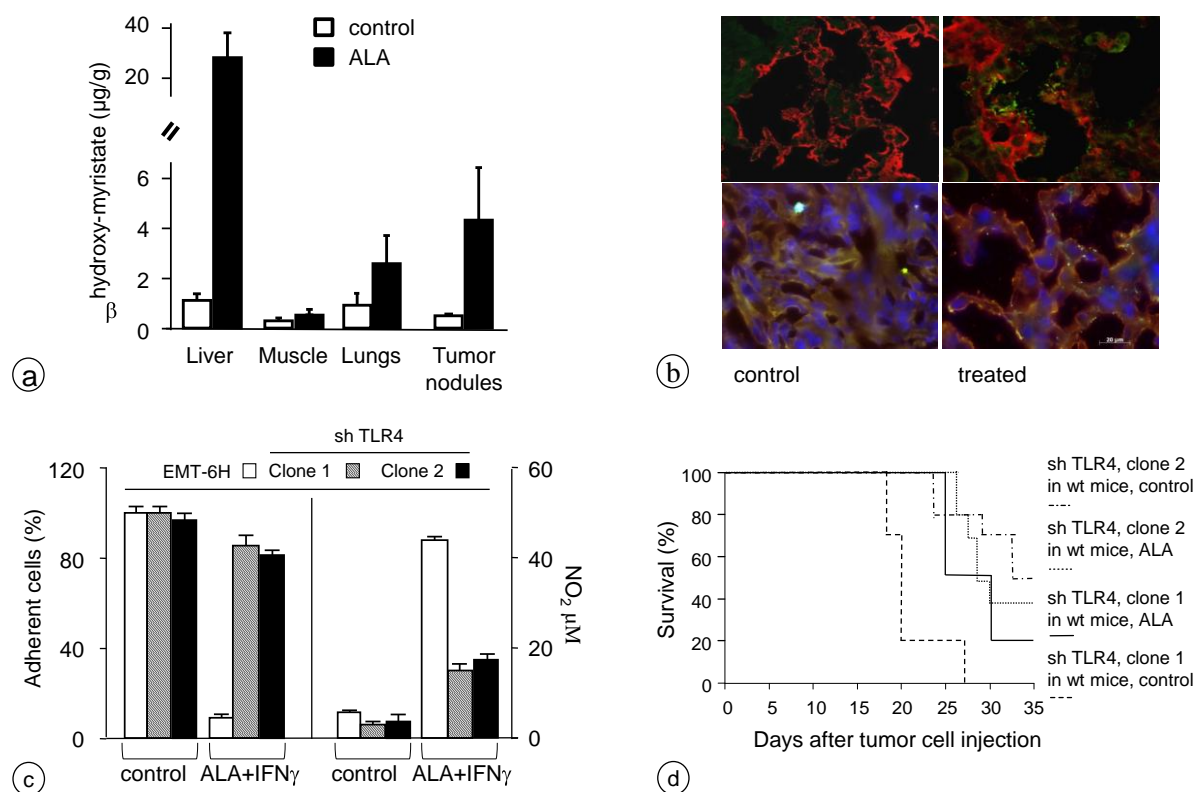


**Figure 3.** ALA acted directly on EMT-6H cells in vitro through TLR4.

a) EMT-6H cells were incubated with anti-TLR4/MD2 monoclonal antibody (TLR4) or IgG isotype control antibody (IG) then with an Alexa Fluor 488-coupled secondary antibody. Fluorescence analyzed using a FACScan flow cytometer showed spontaneous TLR4 expression.

b) NOSII expression in EMT-6H cells was determined by immunoblot after 6 h incubation of EMT-6H cells with (+) or without (-) ALA (500 ng/ml) plus IFN $\gamma$  (33 ng/ml). Incubation with an anti-TLR4/MD2 antibody before adding ALA and IFN $\gamma$  inhibited NOSII expression.

c) EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h and treated with ALA (500 ng/ml) and/or IFN $\gamma$  (33 ng/ml) for 48 h. Anti-TLR4/MD2 antibody was added to some cell samples before adding ALA or IFN $\gamma$ . Nitrite concentration in culture medium was measured using the Griess technique. ALA + IFN $\gamma$  induced significant levels of nitrite accumulation but the anti-TLR4/MD2 antibody significantly reduced ( $p < 0.05$ ) this nitrite accumulation.



**Figure 4.** ALA binding to tumor cell TLR4 was involved in its antitumor effect in vivo.

Mice were treated as described in Figure 1 then killed after the 3<sup>rd</sup> ALA injection. Livers, muscles, lungs and lung nodules were taken from 27 ALA-treated and 12 control mice.

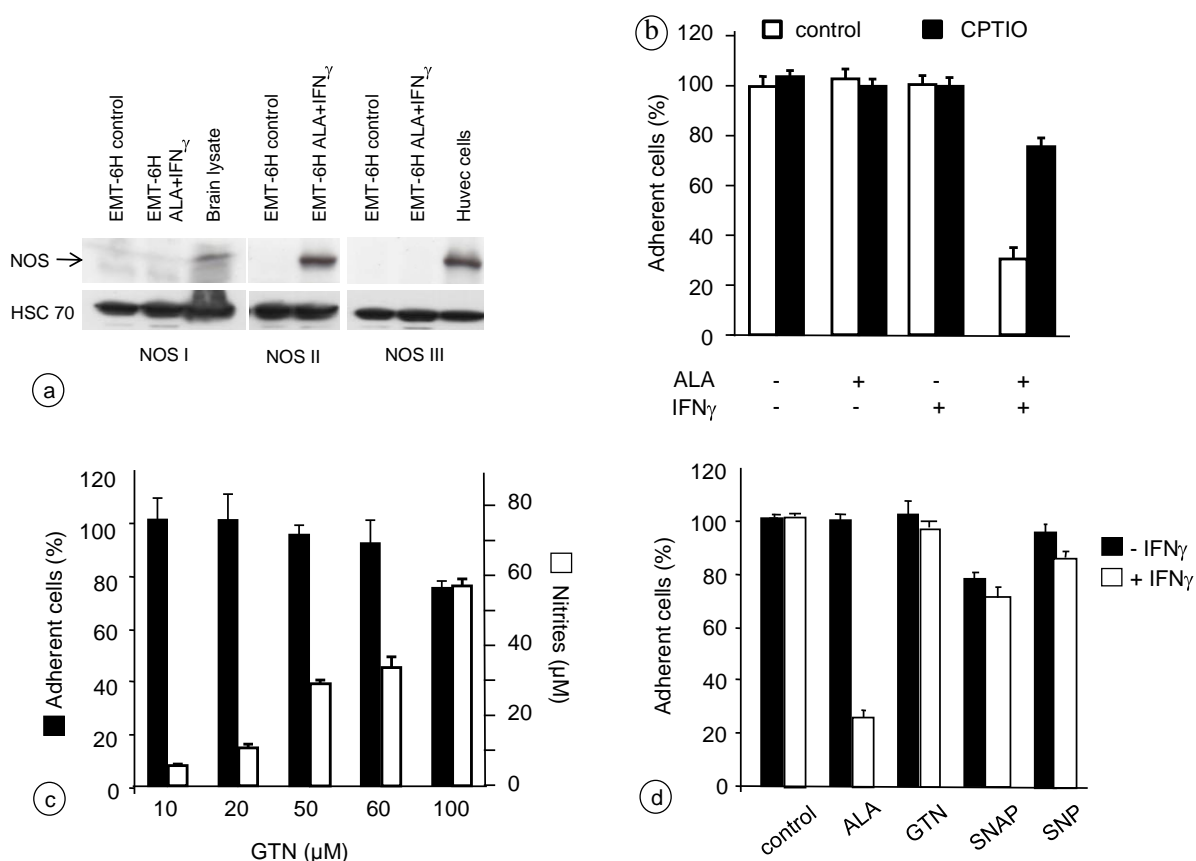
a) ALA was extracted from tissue samples and  $\beta$ -hydroxymyristic acid was measured using HPLC. The concentration of  $\beta$ -hydroxymyristic acid ( $\mu\text{g}$  per g of tissue) was significantly higher in the liver ( $p < 0.001$ ), lungs and tumor nodules ( $p < 0.01$ ) of ALA-treated mice.

b) Tumor nodules were harvested from lungs after the 3<sup>rd</sup> ALA injection. Tumor samples were fixed with formalin and sections were obtained from a paraffin block. Upper panel. The sections were stained with anti-TLR4 antibody (red) and anti-ALA antibody (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Lower panel. Slides were stained with anti-TLR4 (green), anti-CK19 (red) and anti-ALA (cyan) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). Data from one experiment representative of two experiments are shown.

c) Mutated EMT-6H cells (clone 1 or 2) in which TLR4 expression was downregulated by shRNA were cultured in 96-well plates for 24 h then treated with ALA (500 ng/ml) plus IFN $\gamma$  (33 ng/ml) for 48 h. Live cell density was determined with a methylene blue test (left panel). Nitrite concentration in culture medium was measured using the Griess technique (right

panel). ALA + IFN $\gamma$  added to wt cells were cytotoxic ( $p < 0.005$ ) and induced significant nitrite accumulation ( $p < 0.005$ ) that was significantly less in TLR4 deficient cells ( $p < 0.005$ ).

d) Mice were treated as described in Figure 1. Data from 2 representative experiments out of 4 experiments are shown. There was a group effect on survival (log-rank test score = 33.81;  $P < 0.001$ ). Mice injected with clone 2 survived significantly longer than mice injected with clone 1 (post-hoc contrast test,  $z = -3.903$ ,  $P < 0.001$ ) but no difference in survival rate was found within clone 1 groups (control versus ALA; post-hoc contrast test,  $z = -0.58$ ,  $P = 0.56$ ) or within clone 2 groups (control versus ALA; post-hoc contrast test,  $z = 0.607$ ,  $P = 0.54$ ).



**Figure 5.** NO produced by NOSII was necessary but not sufficient to induce tumor cell toxicity.

a) EMT-6H cells were cultured in 6-well plates for 24 h and treated with ALA (500 ng/ml) and IFN $\gamma$  (33 ng/ml) for 6 h then lysed. Immunoblotting of proteins was performed with anti-NOSII, I and III and anti HSC70 antibodies respectively. Brain lysate and Huvec cell lysate were positive controls for NOSI and III respectively. Data from one experiment representative of two experiments are shown.

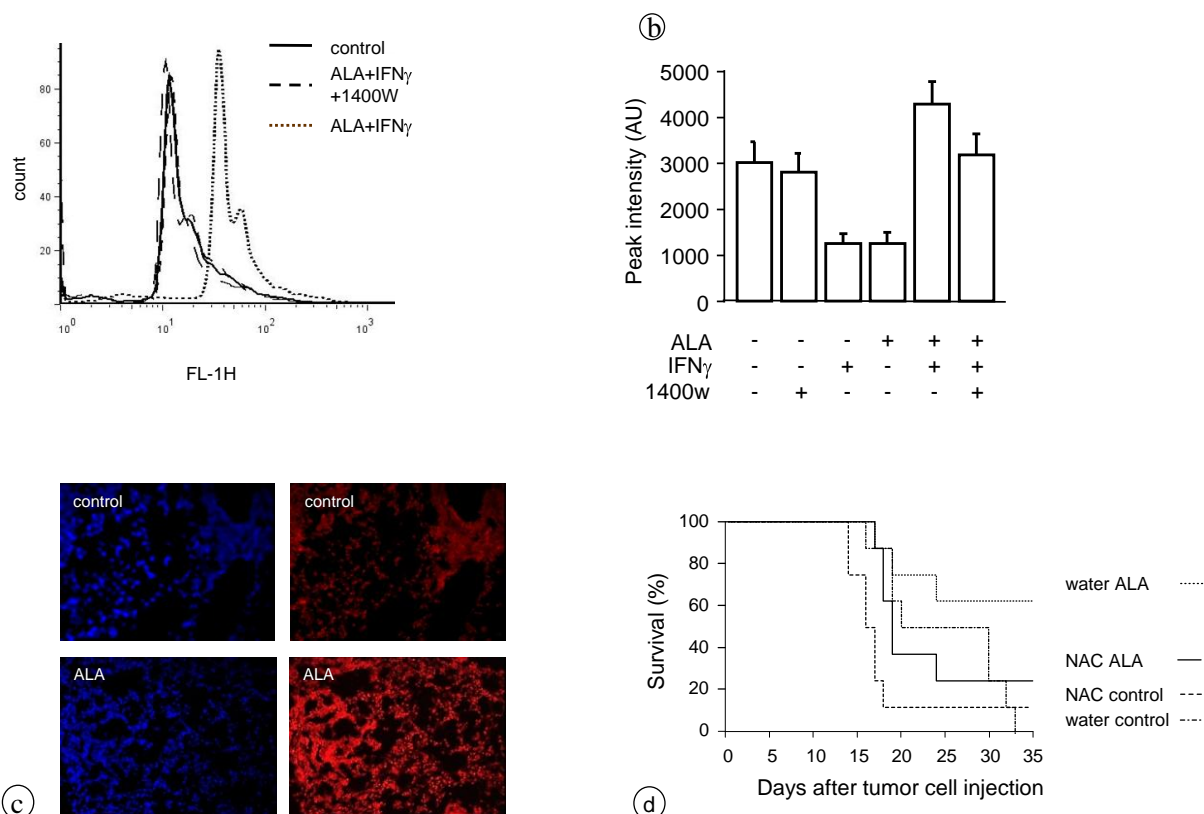
b) EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h then treated with ALA (500 ng/ml), IFN $\gamma$  (33 ng/ml) or 50  $\mu$ M CPTIO for 48 h. Live cell density was determined with a methylene blue test. ALA + IFN $\gamma$  were cytotoxic ( $p < 0.005$ ) but this cytotoxicity was inhibited by CPTIO ( $p < 0.005$ ). The data of one experiment representative of 5 experiments are shown.

c) EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h then treated with GTN for 48 h. Live cell density was determined with a methylene blue test. Nitrite concentration in culture medium was measured using the Griess technique. GTN at concentrations equal to or higher

than 20  $\mu\text{M}$  induced significant accumulation of nitrites ( $p < 0.05$ ) but cytotoxicity was only significantly induced at about 60  $\mu\text{M}$  nitrites (100  $\mu\text{M}$  GTN).

d) EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h and treated with  $\text{IFN}\gamma$  alone (33 ng/ml) or with ALA (500 ng/ml), 20  $\mu\text{M}$  GTN, 50  $\mu\text{M}$  SNAP or 0.5  $\mu\text{M}$  SNP for 48 h. Live cell density was determined with a methylene blue test. Only ALA +  $\text{IFN}\gamma$  induced significant cytotoxicity ( $p < 0.001$ ).





**Figure 6.** ALA plus IFN $\gamma$  induced ROS production involved in their anti-tumor effect.

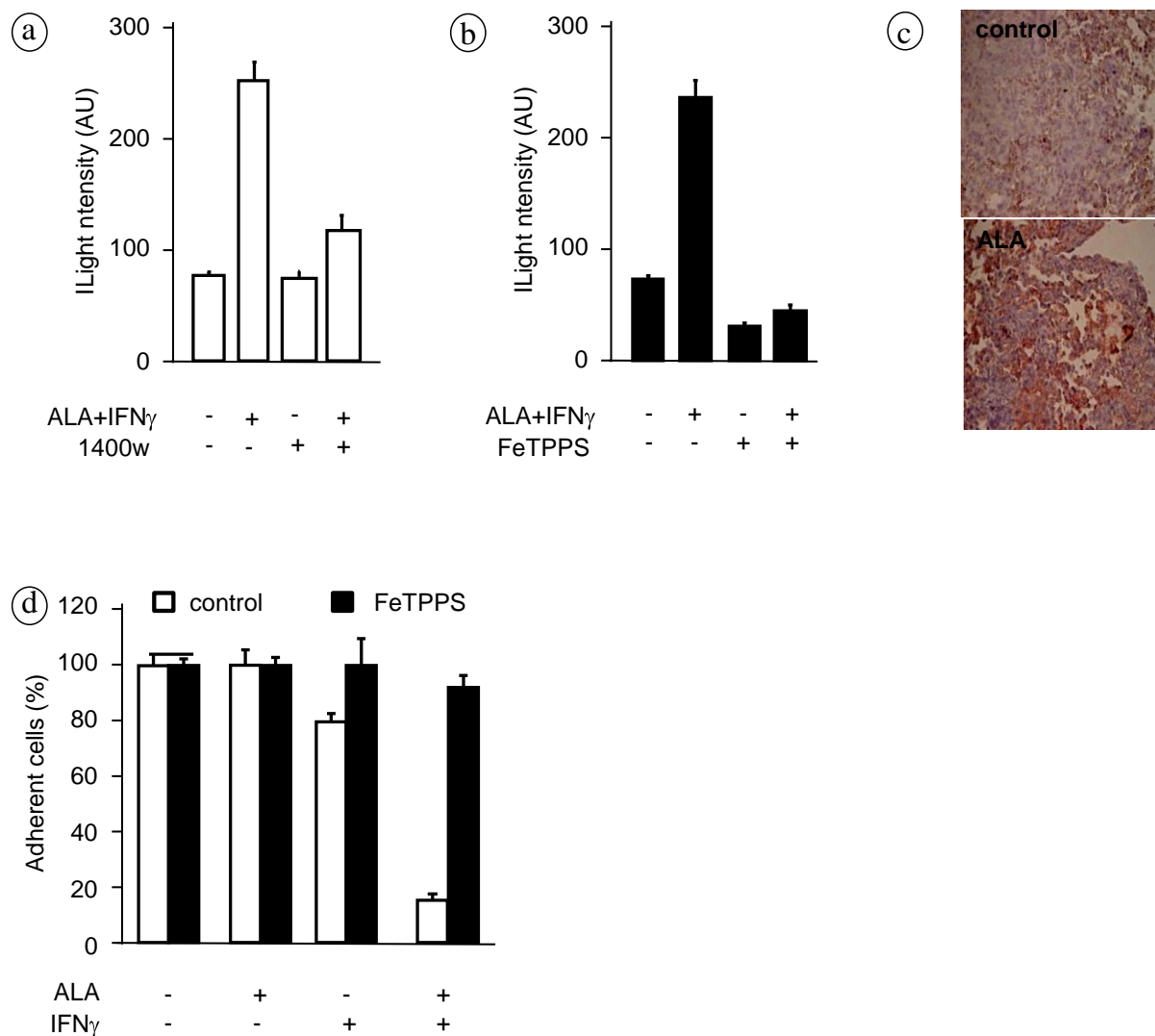
a) EMT-6H cells were cultured in 6-well plates for 24 h and treated with ALA (500 ng/ml) and IFN $\gamma$  (33 ng/ml) with or without 10  $\mu$ M 1400W for 24 h. ROS production was detected by adding DHE for 30 min before analyzing cell samples by flow cytometry.

b) EMT-6H cells were cultured in 6-well plates for 6 h and treated with (+) or without (-) ALA (500 ng/ml), IFN $\gamma$  (33 ng/ml) or 10  $\mu$ M 1400W for 24 h. Production of superoxide anions was detected by adding CMH for 15 min before analyzing cell samples by Electronic paramagnetic resonance. Data show the mean light intensity emitted and are representative of 2 independent experiments.

c) Mice treated as described in Figure1 were killed after the 3<sup>rd</sup> ALA injection, then tumor nodules were taken from lungs, embedded in Tissue-Tek and frozen in liquid nitrogen. Sections were incubated with DHE which fluoresces red in the presence of ROS when examined with fluorescence microscope. Cell nuclei were stained with DAPI (blue).

d) ALA-treated or control mice were given drinking water *ad libitum* containing 3.5 mg/ml NAC or not (water) throughout the treatment. The data from one experiment representative of two are shown with 10 mice per group showing a group effect (log rank test = 11.34, P = 0.01). Mice treated with ALA survived significantly longer than mice from other test groups

(post-hoc contrast test,  $z = -2.22$ ,  $P = 0.026$ ). ALA was without effect in mice that drank NAC (NAC ALA group versus NAC control group) and NAC reduced the antitumor activity of ALA (NAC ALA group versus water ALA group).



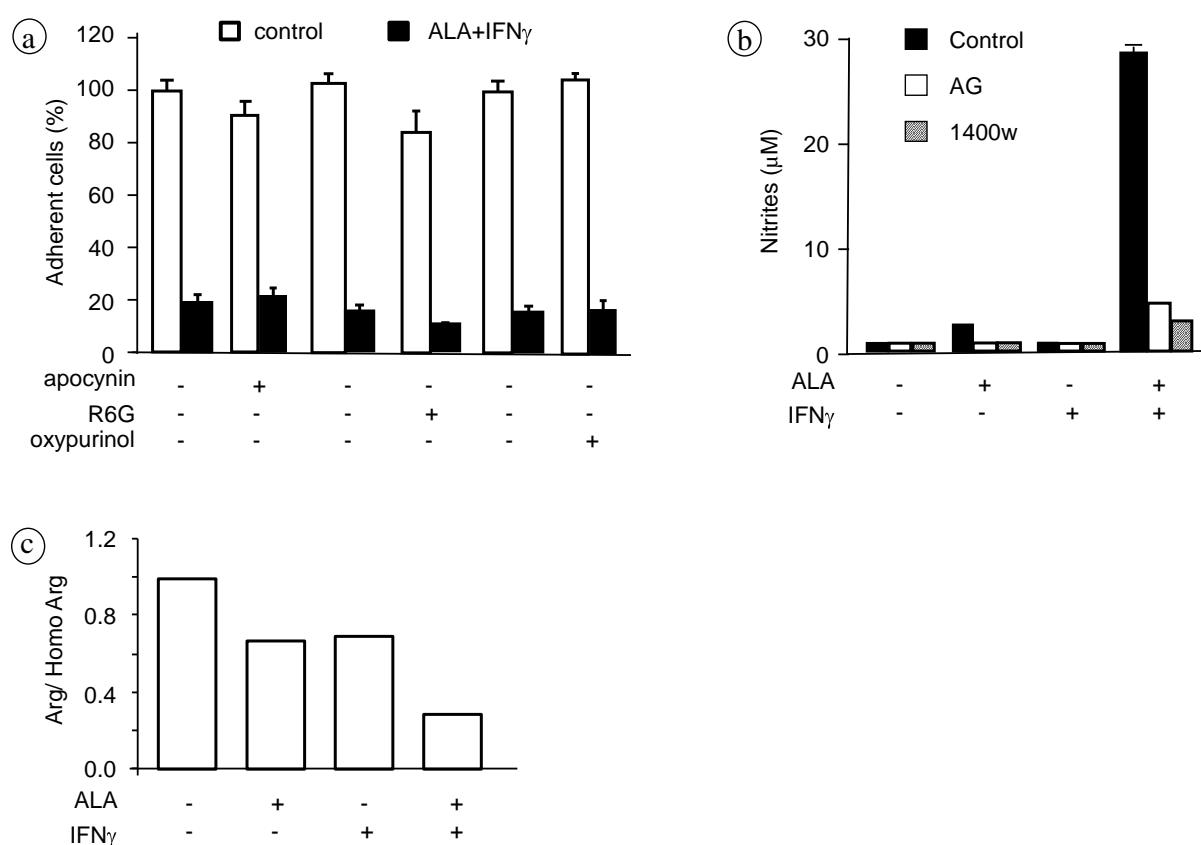
**Figure 7.** The toxic effect of ALA plus IFN $\gamma$  on EMT-6H cells was due to peroxynitrite.

a) EMT-6H cells cultured in 75-cm<sup>2</sup> flasks for 24 h were treated with (+) or without (-) ALA (500 ng/ml) plus IFN $\gamma$  (33 ng/ml) and 10  $\mu$ M 1400w for 48 h. Peroxynitrite production was detected by adding luminol to cells and immediately measuring luminescence with a luminometer. ALA + IFN $\gamma$  induced significantly more luminescence ( $p < 0.05$ ) that was significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) by 1400w.

b) EMT-6H cells cultured in 75-cm<sup>2</sup> flasks for 24 h were treated with (+) or without (-)ALA (500 ng/ml) plus IFN $\gamma$  (33 ng/ml) and 150  $\mu$ M FeTPPS for 48 h. Peroxynitrite production was detected by adding luminol to cells and immediately measuring luminescence with a luminometer. ALA + IFN $\gamma$  induced significantly more luminescence ( $p < 0.05$ ) that was significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) by FeTPPS.

c) Mice treated as described in the Figure1 were killed after the 3<sup>rd</sup> ALA injection. Tumor nodules were taken from lungs, fixed with formalin, embedded in paraffin, and sectioned. Sections were stained with an anti-NO-tyrosine antibody (red).

d) EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h, treated with (+) or without (-) ALA, (500 ng/ml), IFN $\gamma$  (33 ng/ml), or 150  $\mu$ M FeTPPS for 48 h. Live cell density was determined with a methylene blue test. ALA + IFN $\gamma$  significantly decreased the number of adherent cells ( $p < 0.005$ ), but not in the presence of FeTPPS ( $p < 0.005$ ).



**Figure 8.** NOS II uncoupling was observed when EMT-6H cells were activated with ALA plus IFN $\gamma$ .

a) EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h and treated with (+) or without (-) Nox inhibitors either 300  $\mu$ M apocynin, 0.3  $\mu$ M rhodamine 6G or 150  $\mu$ M oxypurinol for 1 h before adding ALA (500 ng/ml) plus IFN $\gamma$  (33 ng/ml) for 48 h. Live cell density was determined in a methylene blue assay. No difference was measured between cells incubated with or without inhibitors in the presence or absence of ALA + IFN $\gamma$ .

b) EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h and treated with (+) or without (-) ALA (500 ng/ml) and IFN $\gamma$  (33 ng/ml) for 48 h. To specifically inhibit NOSII activity 0.5mM AG or 10 $\mu$ M 1400w were added before treatment with ALA and/or IFN $\gamma$ . Nitrite accumulation in culture medium was measured using the Griess technique. ALA and IFN $\gamma$  together induced nitrite accumulation ( $p < 0.005$ ) that was inhibited by both AG and 1400w ( $p < 0.005$ ).

c) EMT-6H cells were cultured in 6-well plates for 48 h and treated with (+) or without (-) ALA (500 ng/ml) or IFN $\gamma$  (33 ng/ml). L-arginine was measured in cell extracts by HPLC

using homo-L-arginine as the internal standard. Data from one experiment representative of two experiments are shown.

### **List of supplemental information**

Figure S1. TNF- $\alpha$  was not a mediator of the ALA antitumor effect

Figure S2. Loss of NOSII expression in IRF2 deficient cell clones A and B

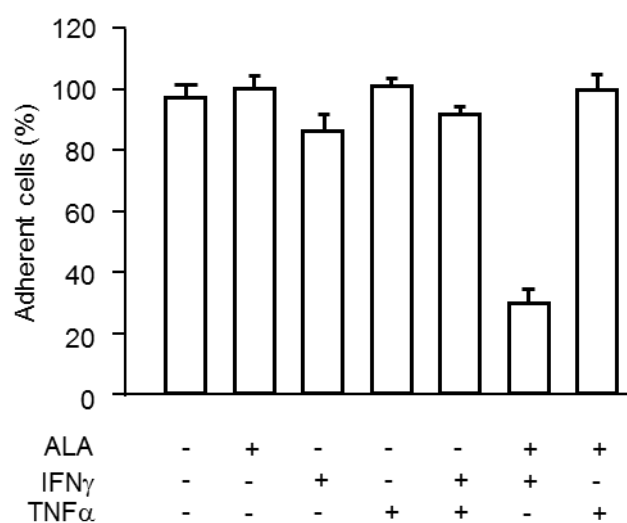
Figure S3. Loss of NOSII expression in TLR4 deficient cell clones 1 and 2

Figure S4. Peroxynitrite donor SIN-1 had a toxic effect on EMT-6H cells

Supplemental experimental procedures

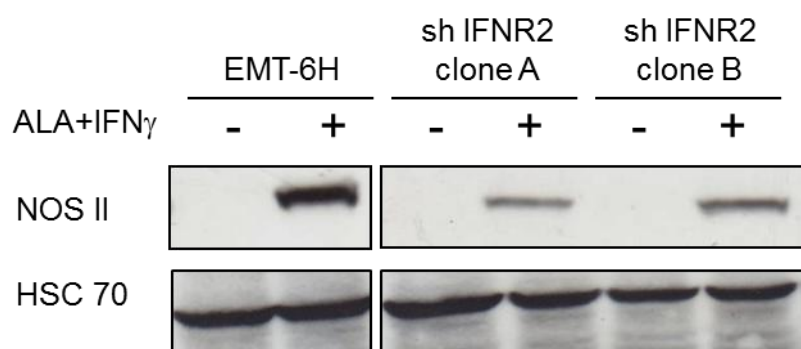
Supplemental references

## Supplemental figures with legends



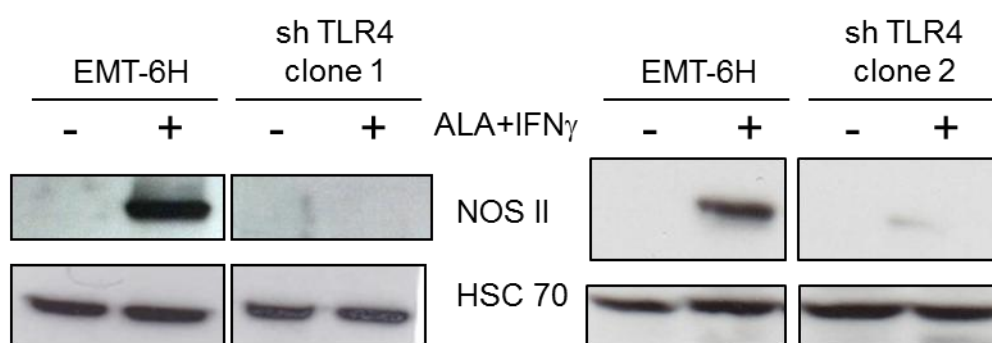
**Figure S1.** *TNF- $\alpha$  was not a mediator of the ALA antitumor effect.*

This figure relates to data shown in Figure 2. EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h, treated with (+) or without (-) 500 ng/ml ALA, 33 ng/ml IFN- $\gamma$  or 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 48 h. Live cell density was determined by a methylene blue test. ALA, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  alone were not cytotoxic while ALA and IFN $\gamma$  together were cytotoxic ( $p < 0.01$ ). The data from one experiment representative of three experiments are shown.



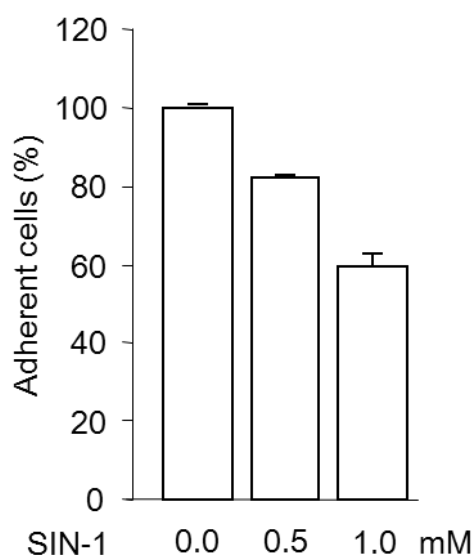
**Figure S2.** *Loss of NOSII expression in IRF2 deficient cell clones A and B.*

This figure relates to data shown in Figure 2. Wild-type and mutated cells (clone A or clone B) in which IFNR2 expression was reduced (by specific shRNA expression) were cultured in 6-well plates for 24 h then treated with (+) or without (-) 500 ng/ml ALA and 33 ng/ml IFN $\gamma$  for 6 h. After Western blotting, anti-NOSII and anti-HSC70 antibodies were used for immunodetection of proteins. The figure shows one blot with the same exposure time and is representative of three experiments.



**Figure S3.** Loss of NOSII expression in TLR4 deficient cell clones 1 and 2.

This figure relates to data shown in Figure 4. Wild-type or mutated cells (clone 1 or clone 2) in which TLR4 expression was reduced (by specific shRNA expression) were cultured in 6-well plates for 24 h then treated with (+) or without (-) 500 ng/ml ALA and 33 ng/ml IFN $\gamma$  for 6 h. After Western blotting, anti-NOSII and anti-HSC70 antibodies were used for immunodetection of proteins. The figure shows one blot with the same exposure time and is representative of three experiments.



**Figure S4.** Peroxynitrite donor SIN-1 had a toxic effect on EMT-6H cells.

This figure relates to data shown in Figure 7. EMT-6H cells were cultured in 96-well plates for 24 h then treated for 48 h with SIN-1. Live cell density was determined by a methylene blue test. Data are the mean of 3 independent experiments. SIN-1 was significantly cytotoxic ( $p < 0.05$ ).

## SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Cells, animals and immunotherapy

EMT-6 tumor cells were originally obtained from a mammary tumor growing spontaneously in a Balb/c mouse (Rockwell et al. 1972) and were cloned according to their production of NO. EMT-6H cells produce a low concentration of nitrite in the culture medium after IL-1 $\beta$  activation (Gauthier et al. 2004). EMT-6H cells ( $10^5$ ) were injected in the caudal vein of Balb/c mice. Tumor-bearing mice were treated i.v. with the lipid A analog OM-174 (OM PHARMA, Meyrin, Switzerland), (8 mg per kg of mouse) starting on the day 5 after tumor cell injection. ALA was dissolved in saline solution and control mice were treated with saline solution only. On day 35, any surviving mice were euthanized and autopsied. Aminoguanidine (AG), an inhibitor of NOSII, was dissolved in saline solution and injected i.p. at the dose of 50 mg per kg twice a day throughout the treatment.



We checked the inhibition of NOSII by measuring its activity in the liver of mice injected with LPS comparing it to that of mice treated with LPS plus AG. The blood pressure of these mice did not change during the experiment, indicating that NOSIII was not affected by the treatment.

### Drugs and reagents

ALA (OM-174) was a gift from OM PHARMA (Meyrin, Switzerland). It has been chemically characterized as 2-deoxy-6-O-[2-deoxy-2- [ (R)-3-dodecanoyloxytetra decanoylamino]-4-O-phospho- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-2-[ (R)-3-hydroxytetradecanoylamino]- $\alpha$ -D-glycopyranosyl dihydrogenphosphate. Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was from Peprotech Inc. (Le Perray en Yvelines, France) and the NO donor glyceryl trinitrate (GTN) from Merck (Lyon, France). S-nitroso-N-acetylpencillamine (SNAP) and SIN-1 (3-morpholinostyrylamine hydrochloride) were from Biomol International (Exeter, UK) and sodium nitroprusside (SNP) was from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). The peroxyxynitrite decomposition catalyst 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinato iron (III) chloride (FeTPPS) was purchased from Calbiochem (San Diego, USA). The probes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH<sub>2</sub>-DA ) and dihydroethidium (DHE) were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) and hydroxylamine 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH) was from Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France). DAKO fluorescent mounting medium and 2- (4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (CPTIO) were from DAKO Corporation (Carpinteria, USA). NOS inhibitors N-[3- (aminomethyl)benzyl]acetamidine (known as 1400W) was from Calbiochem and aminoguanidine (AG) was from Sigma. All other chemical reagents were from Sigma.

### Antibodies

Anti-TLR4, anti-TLR4/MD2 complex, and anti-HSC70 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Anti-ALA was obtained from Covalab (Dijon, France). Anti-NOSII was purchased from Becton Dickinson Transduction Laboratories (Le Pont de Claix, France), anti-NOS I and anti-NOSIII antibodies were from Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Anti-nitrotyrosine (Tyr-NO) antibody was from Cayman Chemical (Cayman Europe, Teaduspargi, Estonia). Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG was from Dako (Glostrup, Denmark) and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies were from Jackson

Immunoresearch Laboratories (West Grove, USA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled goat anti-rat IgG and alexa fluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibodies were from Molecular Probes (Cergy Pontoise, France).

#### Cell culture

EMT-6H cells were grown in Eagle's minimal essential medium (EMEM, Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with fetal calf serum (FCS free of LPS, Hyclone, Biovalley, Marne la Vallée, France) and 2 mM L-glutamine (Biowhittaker, Fontenay-sous-Bois, France), in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub> and 95% air). Cultures were tested for *Mycoplasma* contamination monthly and before each *in vivo* experiment with the Mycotect kit (Life Technologies, Cergy Pontoise, France).

#### Procedures

##### ***Transfections***

EMT-6H cells were transfected according to the Qiagen kit protocol. The SureSilencing shRNA plasmids were from Invivogen (Toulouse, France). The sequences used to design the encoded shRNAs were: for shTLR4, 5'-GCCGTTGGTGTATCTTTGAAT-3' with neomycin resistance; and for shIFNR2, 5'-GTGGAGCCATTTC AACACTAT-3' with puromycin resistance. Transfected clones were selected with 600 µg/ml neomycin for TLR4 mutants and 2.5 µM puromycin for IFNR2 mutants.

##### ***Immunoblot analysis***

After appropriate stimulation, cells were washed with ice-cold PBS, scraped from the vessel surface, centrifuged and proteins were extracted with RIPA (radio immunoprecipitation assay) buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate) containing a mixture of protease inhibitors (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Lysates were harvested and protein concentration was measured using a Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, USA). Thirty to fifty micrograms of proteins were incubated with loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol and 0.003% bromophenol blue), separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Orsay, France).

After blocking non-specific binding sites with 8% non-fat milk in 0.1% Tween 20 PBS (TPBS), immunoblots were incubated with specific primary antibody, followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and were developed by the enhanced chemiluminescence method according to the manufacturer's protocol (Santa Cruz Biotechnology).

### ***Immunohistofluorescence***

Slides were deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was performed by heating the slides in citrate buffer pH 7.3 (DiaPath, Martinengo, Italy) at 96°C for 20 min in a water bath. After blocking nonspecific sites with 3% BSA in PBS for 30 min at room temperature (RT), slides were incubated with mouse anti-TLR4 antibody diluted 1:100 in PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS) with 1% BSA for 1 h at RT, or with a rabbit anti-ALA antibody diluted 1:100 for 45 min at RT. Slides were then washed and nonspecific sites were blocked with 3% BSA and 10% mouse serum or rabbit serum in PBS for 30 min at RT. Then they were incubated for 30 min with an Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse antibody (diluted 1:1000 in 1% BSA in PBS-T) or with an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (diluted 1:1000) for 30 min. After repeated washing, slides were mounted using Prolong Gold (Invitrogen).

The same method was used with a rabbit anti-cytokeratin19 antibody (diluted 1:100) and an Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit antibody (diluted 1:1000), then a mouse anti-TLR4 antibody (diluted 1:100) and an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse antibody (diluted 1:1000), then a rabbit anti-ALA antibody (diluted 1:100) with an Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit antibody (diluted 1:1000). Slides were mounted using Prolong Gold (Invitrogen).

The formation *in vivo* of NO-tyrosine was investigated in tumors. Endogenous peroxidases were blocked by incubation for 20 min with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS at RT. Nonspecific sites were blocked with BSA. Slides were incubated with a mouse anti-NO-tyrosine antibody diluted 1:100. After repeated washing, slides were incubated with a biotin conjugated goat anti-mouse antibody diluted 1:200. After repeated washing, slides were incubated with a peroxidase-conjugated streptavidine antibody diluted 1:1000. Finally AEC staining was performed and slides were mounted using aqueous mounting medium.

### ***Measurement of live cell density***

EMT-6H cells were treated then carefully washed with phosphate buffered saline (PBS), fixed in ethanol during 30 min, dried and stained with a 5% methylene blue solution for 30 min. Blue-stained adherent cells (i.e. living cells) were washed with water and dissolved in a 0.1 N HCl solution. The absorbance, which is proportional to the number of stained cells, was measured at 590 nm in a multi-well microtiter plate reader.

### ***Flow cytometry analysis***

Surface TLR4/MD2 expression was determined by flow cytometry. Briefly, cells were washed with cold PBS. Then,  $10^6$  cells were incubated in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% sodium azide for 1 h at 4°C with a rat anti-TLR4/MD2 monoclonal antibody diluted 1:100 or a rat IgG isotype control antibody diluted 1:10,000. Cells were washed in PBS with 0.1% sodium azide, followed by incubation with an Alexa Fluor 488-coupled goat anti-rabbit antibody diluted 1:1,000 or goat anti-rat antibody diluted 1:1,000 in PBS with 1% BSA and 0.1% sodium azide for 45 min at 4°C. Cells were washed and resuspended in cold PBS. Fluorescence was analyzed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

### ***Determination of NO production***

Cells were seeded in 96-well plates, and after stimulation, nitrite concentrations in supernatants were measured. Briefly, 100 µl of supernatant were added to 100 µl of Griess reagent (0.5 % sulfanilamide and 0.05 % naphthylethylenediamine in 2.5 % phosphoric acid). The ratio of absorbance at 550 nm and 690 nm was measured in a multi-well microtiter plate reader and nitrite concentration was calculated by comparison with a standard sodium nitrite solution.

### ***Measurement of reactive oxygen species (ROS) by fluorescence***

The intracellular production of superoxides was measured using the oxidation of dehydroethydine (DHE) to fluorescent derivatives according to previously described protocols with some modifications (Vanden Hoek et al. 1997). Cells were stained with 5 µM DHE in saline solution at 37°C for 15 min and examined by a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

Slides were thawed and incubated 10 min in an acetone bath. After drying, the slides were incubated in the dark at room temperature with the DHE probe at 20  $\mu$ M in PBS. Then they were washed 5 min in a PBS bath at room temperature in the dark. After drying, slides were mounted using Prolong Gold (Invitrogen). Slides were then observed by fluorescence microscopy.

### ***Measurement of ROS by EPR spectroscopy***

In some experiments, generation of ROS was probed by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) by using cyclic hydroxylamine 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH) (Alexis Biochemicals, Lyon, France). CMH stock solutions were prepared in PBS containing 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) to inhibit metal ion-catalyzed hydroxylamine autoxidation and were stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Incubation of EMT-6H cells with CMH resulted in the generation of the EPR signal of 3-methoxycarbonyl-proxyl nitroxide ( $\text{CM}^{\bullet}$ ) that was detected at room temperature using a Bruker Elexys E500 spectrometer (Bruker BioSpin, Wissembourg, France) following the protocol (Palazzolo-Ballance et al. 2007). Briefly,  $10^6$  cells were washed with PBS, resuspended in 1 mL buffer containing 100  $\mu$ M DTPA and 0.5 mM of CMH were added. The suspension was incubated for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and then frozen in liquid nitrogen before EPR analysis. Samples were transferred into an AquaX quartz cell (Bruker) inserted into a SHQ0011 cavity (Bruker). Spectra were recorded at room temperature. In some experiments, 100 U/mL catalase and/or 100 U/mL SOD were added to inhibit extracellular reactions of the probe with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and/or  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . The results from the various assays were normalized to the number of cells used in the experiment.

### ***Peroxynitrite detection***

Peroxynitrite was detected using the luminol chemiluminescent assay as previously described (Radi et al. 1993). Cells ( $10^7$ ) were washed and resuspended in saline solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5.6 mM glucose, 20 mM Hepes, pH 7.4) and incubated with 500  $\mu$ M luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione) (Sigma) at  $37^{\circ}\text{C}$ . Luminescence was detected using a Victor Wallac luminometer at  $37^{\circ}\text{C}$ .

### ***Measurement of L-Arg concentration***

Amino acids were derivatized and separated by reverse-phase High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) according to the procedure described by Clague *et al.* (Clague et al. 1997). Thus, 10  $\mu$ L of cell supernatant and 10  $\mu$ L of 100  $\mu$ M homo-L-Arg (used as an internal standard) were mixed in HPLC vials with 120  $\mu$ L of 0.1 M potassium borate (pH 9.5), 10  $\mu$ L of 0.5 M NaCN in the same borate buffer, and 50  $\mu$ L of 10 mM 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde (Sigma) in methanol. The mixture was allowed to stay at room temperature for 15 min. Samples (25  $\mu$ L) were applied to a X-Terra C<sub>18</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m particle size, Phenomenex, Le Peck, France), which was maintained at 40 °C and equilibrated with 80% of 5 mM ammonium acetate buffer (pH 6.0) (solvent A) and 20% acetonitrile (solvent B). Elution conditions were as follows: 2 min at 20% solvent B, linear increase from 20% to 80% solvent B over 30 min and from 80% to 100% over 3 min, followed by 2 min of 100% solvent B, and a return to the initial conditions over 3 min. The flow rate was 0.75 mL/min, and detection was performed at 420 nm. Retention times were 13.2 min for L-Arg and 13.8 min for homo-L-Arg.

### ***Measurement of arginase activity***

A previously described assay was used to quantify [<sup>14</sup>C]urea produced from [U-<sup>14</sup>C]L-Arg (Cavalli et al. 1994). A typical assay (final volume 100  $\mu$ L) was performed in 0.2 M Tris-HCl (pH 7.4) containing 1 mM L-Arg, 0.1  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]L-Arg (300 mCi/mmol, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). The reactions were initiated by adding 20  $\mu$ L of cell supernatant. After 1 h at 37 °C, 150  $\mu$ L of cold stop buffer (0.25 M AcOH and 5 M urea) was added and [<sup>14</sup>C]urea was separated from unreacted [U-<sup>14</sup>C]L-Arg by mixing with 250  $\mu$ L of a 1:1 slurry of Dowex AG-50W-X8 (H<sup>+</sup> form) then centrifuging. Aliquots of the supernatants (250  $\mu$ L) were counted in a Packard TriCarb 2300TR (Perkin-Elmer) scintillation counter after addition of Pico-Fluor 40.

### ***Lipid A quantitation***

Organs were collected and immediately stored in liquid nitrogen. The amounts of ALA were determined by direct quantitation of  $\beta$ -hydroxymyristic acid by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with 3-hydroxypentadecanoic acid used as an internal standard

(Parlesak and Bode 1995). GC-MS analysis of  $\beta$ -hydroxymyristic acid was performed using the selected ion monitoring mode.

#### ***Analysis of biopterin in cell supernatants.***

Biopterin levels were measured by reverse-phase HPLC after oxidation. Amounts of H<sub>4</sub>B were calculated from the difference in biopterin concentrations measured after oxidation in acid (total biopterins) and base (H<sub>2</sub>B + biopterin) (Heller et al. 2001).

#### ***Statistics***

Data are presented as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Paired groups were compared with the Student's *t* test. A *P* value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

*In vivo* survival data were plotted by computing the Kaplan-Meier estimators which can be used to analyze observations for which the complete distribution is not known (i.e., censored data). Cox proportional hazards regressions were performed to test for differences among *in vivo* groups. Survival analyses were performed with R software version 2.15.0 (R Development Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <http://www.R-project.org>).

## SUPPLEMENTARY REFERENCES

- Cavalli, R. C., Burke, C. J., Kawamoto, S., Soprano, D. R., and Ash, D. E. (1994). Mutagenesis of rat liver arginase expressed in *Escherichia coli*: role of conserved histidines. *Biochemistry* 33, 10652-10657.
- Clague, M. J., Wishnok, J. S., and Marletta, M. A. (1997). Formation of N delta-cyanoornithine from NG-hydroxy-L-arginine and hydrogen peroxide by neuronal nitric oxide synthase: implications for mechanism. *Biochemistry* 36, 14465-14473.
- Gauthier, N., Lohm, S., Touzery, C., Chantome, A., Perette, B., Reveneau, S., Brunotte, F., Juillerat-Jeanneret, L., and Jeannin, J. F. (2004). Tumour-derived and host-derived nitric oxide differentially regulate breast carcinoma metastasis to the lungs. *Carcinogenesis* 25, 1559-1565.
- Heller, R., Unbehaun, A., Schellenberg, B., Mayer, B., Werner-Felmayer, G., and Werner, E. R. (2001). L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *The Journal of biological chemistry* 276, 40-47.
- Palazzolo-Ballance, A. M., Suquet, C., and Hurst, J. K. (2007). Pathways for intracellular generation of oxidants and tyrosine nitration by a macrophage cell line. *Biochemistry* 46, 7536-7548.
- Parlesak, A., and Bode, C. (1995). Lipopolysaccharide determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography after fluorescence labeling. *Journal of chromatography A* 711, 277-288.
- Radi, R., Cosgrove, T. P., Beckman, J. S., and Freeman, B. A. (1993). Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *The Biochemical journal* 290 ( Pt 1), 51-57.
- Rockwell, S. C., Kallman, R. F., and Fajardo, L. F. (1972). Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor and its tissue-culture-adapted derivative. *J Natl Cancer Inst* 49, 735-749.
- Vanden Hoek, T. L., Li, C., Shao, Z., Schumacker, P. T., and Becker, L. B. (1997). Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29, 2571-2583.



# Analyse protéomique de la S-nitrosylation dans l'effet anti-tumoral d'un analogue du lipide A : importance d'UBC13

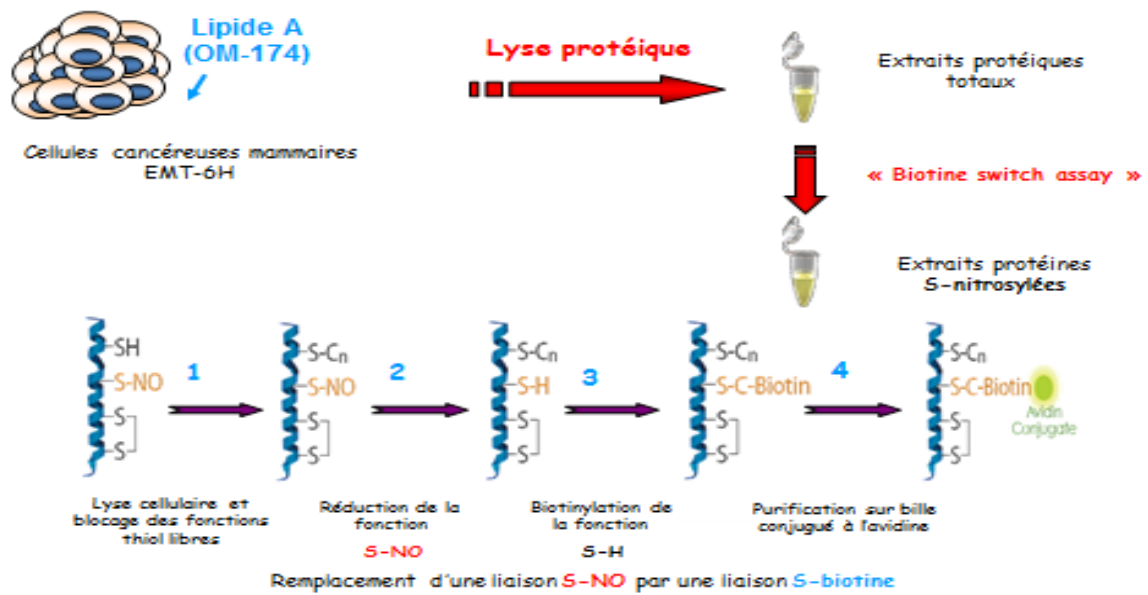
## I. Présentation et objectifs de l'étude

Des études montrent que le NO est capable de réagir avec les résidus cystéines de protéines cibles pour former des S-nitrosothiols par un processus appelé S-nitrosylation et peut modifier ainsi les fonctions de ces protéines (Stamler et al. 1992). L'analyse de cette modification post-traductionnelle est rendue possible grâce au développement d'une technique dite de « biotin switch assay » (BSA) qui consiste à remplacer le NO fixé sur les résidus cystéines par de la biotine rendant plus facile la purification des protéines ayant fixées du NO (Jaffrey et al. 2001). Grâce à cette technique dont les étapes sont décrites dans la figure 27, notre équipe a pu montrer que la S-nitrosylation du récepteur de mort Fas rend les cellules cancéreuses coliques humaines plus sensibles à l'effet pro-apoptotique de son ligand (Leon-Bollotte et al. 2011).

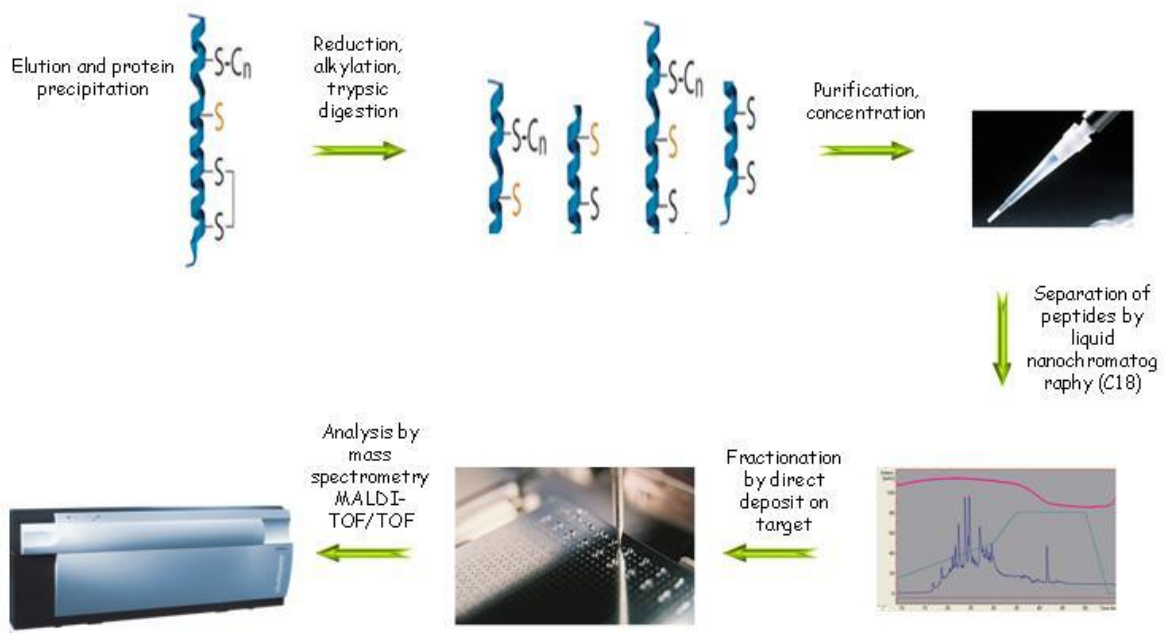
L'objectif de cette étude a été donc d'identifier les cibles protéiques du NO généré par le lipide A et IFN $\gamma$  dans les cellules cancéreuses mammaires EMT-6H et d'analyser leur implication dans l'effet cytotoxique de cette combinaison.

Utilisant la technique de BSA, les protéines S-nitrosylées des cellules EMT-6H traitées par OM-174/IFN $\gamma$  ont été purifiées et ont subi une analyse par spectrométrie en masse en tandem nLC MS/MS dont le principe est résumé dans la figure 28 afin de les identifier.

## Identification de protéines cibles S-nitrosylées



**Figure 27** : Différentes étapes de la technique du « Biotine Switch Assay » (BSA).



Clinical Innovation Proteomic Platform, IFR 100, Dijon

**Figure 28** : Analyse en spectrométrie de masse en tandem nLC MS/MS réalisé en collaboration avec la plateforme de protéomique Clipp de l'IFR100 à Dijon.

## II. Résultats et discussions

### 1. Identification des protéines S-nitrosylées par le lipide A et IFN $\gamma$ dans les cellules cancéreuses mammaires.

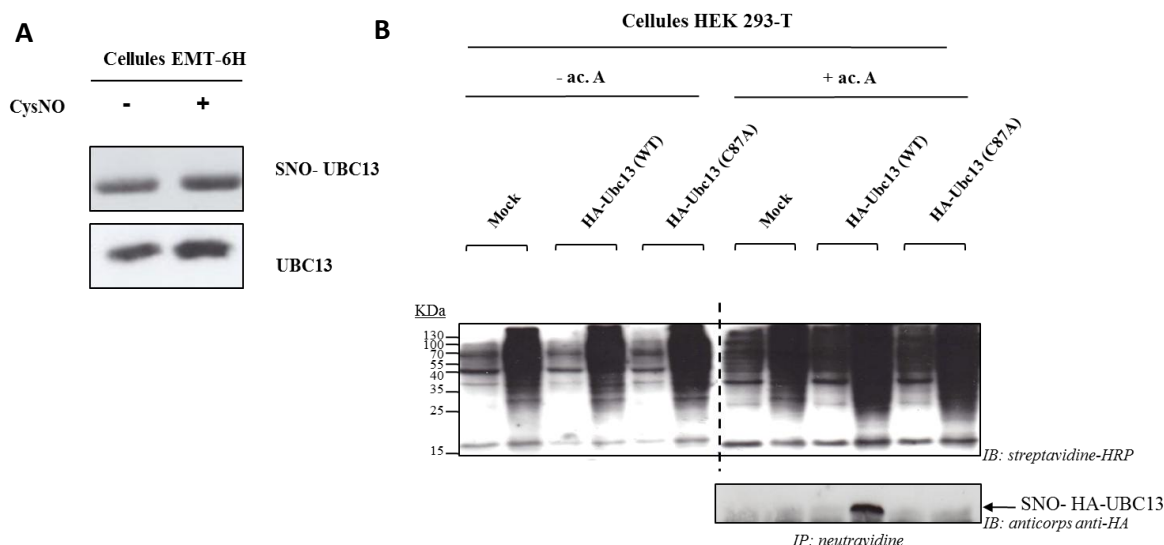
L'analyse des différents peptides utilisant la banque de données *Mammalia* nous a permis d'identifier une dizaine de protéines S-nitrosylées de différentes natures (tableau 5). Certaines sont des protéines de structure telles que l'actine, l'alpha actinine ou la destrine, d'autres sont en relation avec le système immunitaire comme par exemple ERp57, une protéine de stress du réticulum endoplasmique qui contrôle l'exposition membranaire de la calréticuline, une protéine qui permet au système cellulaire de reconnaître ses cibles cellulaires (Panaretakis et al. 2008). L'HLA de classe 1, un antigène important dans la cytotoxicité des cellules T cytotoxiques est également identifié comme étant une protéine cible du NO. Des résultats du laboratoire montrent que le NO généré après activation de la NOS II ou par un donneur de NO augmente l'expression de la calréticuline et de l'antigène HLA de classe 1 à la surface des cellules de plusieurs types cancéreux incluant le cancer du sein. D'autres protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et dont l'expression est retrouvée augmentée dans certains cancers (nucléophosmine, KCIP-1, isoforme B de la phosphoglycérate mutase) sont également S-nitrosylées par le NO. Dans la suite du travail, nous nous sommes intéressés à l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2, Ubc13 qui se trouve être S-nitrosylée par la combinaison lipide A/IFN $\gamma$ . Le fait que cette enzyme est impliquée dans la réparation de l'ADN et la survie cellulaire (son invalidation chez la souris est létale et une diminution conséquente induit une perte drastique des cellules hématopoïétiques) (Wu et al. 2009), nous a semblé être une intéressante cible à étudier.

SNO-protein identified	Functions
Nucleophosmin (NPM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- centrosome duplication</li> <li>- protein chaperoning</li> <li>- Ag recognized by cytotoxic T lymphocyte</li> <li>- cell proliferation</li> <li>- regulation of tumor suppressors TP53/p53 and ARF</li> <li>- increased in cancer cells</li> </ul>
* Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (Ubc13)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cell survival</li> <li>- DNA repair</li> <li>- Ubc13 deficiency causes drastic loss of multi lineages of blood cells, as well as atrophy of the thymus and bone marrow</li> </ul>
H-2 class I histocompatibility antigen	- HLA restricted cytotoxic T lymphocyte
Protein kinase C inhibitor protein 1 (KCIP-1)	- cell proliferation
Protein disulfide-isomerase A3 precursor (Erp57)	- catalyzes the rearrangement of S-S bonds in proteins
Glutathione S-transferase P	- ER stress protein, a key protein that controls immunogenicity by controlling calreticulin membrane exposure
	- conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles
Destrin (Actin-depolymerizing factor)	- severs actin filaments (F-actin)
	- binds to actin monomers (G-actin)
Alpha-actinin-1	- F-actin cross-linking protein
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	- transcriptional repressor
Phosphoglycerate mutase isozyme B	- glycolytic enzyme
	- brain tumor marker, increased in HCC

**Tableau 5.** Liste des protéines S-nitrosylées par la combinaison lipide A/IFN $\gamma$  dans les cellules cancéreuses mammaires EMT-6H.

## 2. Confirmation de la S-nitrosylation de l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 Ubc13 et identification de la cystéine cible.

Dans un premier temps, nous avons vérifié à l'aide des techniques de BSA et de Western blot que Ubc13 est bien S-nitrosylée dans les cellules EMT-6H traitées par la combinaison lipide A/IFN $\gamma$  (Figure 29A). Cet effet est retrouvé dans la lignée 293T (lignée embryonnaire humaine transformée par SV40), surexprimant la forme sauvage d'Ubc13 et traitée par le donneur de NO nitro-cystéine (CysNO) (Figure 29B). Nous avons également identifié la cystéine 87 comme étant la cible du NO puisque la S-nitrosylation d'Ubc13 est abrogée dans des cellules exprimant l'enzyme dans laquelle le résidu cystéine 87 a été remplacé par une alanine (Figure 29A). Certes, la tâche n'a pas été dure pour identifier le seul résidu cystéine de la protéine. Cependant, il aurait été plus intéressant s'il y avait une ou deux autres cystéines pour qu'on puisse montrer la spécificité ou non de la S-nitrosylation sur la cystéine 87.



**Figure 29 :** Détermination du site de S-nitrosylation de la protéine UBC13. (A) La S-nitrosylation des protéines a été évaluée dans la lignée cancéreuse mammaire murine EMT-6H traitée par la CysNO à la concentration de 1mM pendant 20 minutes. Après purification sur billes de neutravidine, les protéines UBC13 ont été identifiées par immunorévélation avec un anticorps anti-Ubc13. (B) Les cellules HEK -293T ont été transfectées avec les constructions HA-UBC13 WT ou HA-UBC13 C87A puis traitées par la CysNO à la concentration de 1 mM pendant 20 minutes. La S-nitrosylation des protéines a été évaluée par « Biotin Switch Assay ». Après purification sur billes de neutravidine, les protéines HA-UBC13 ont été identifiées par immunorévélation avec un anticorps anti-HA.

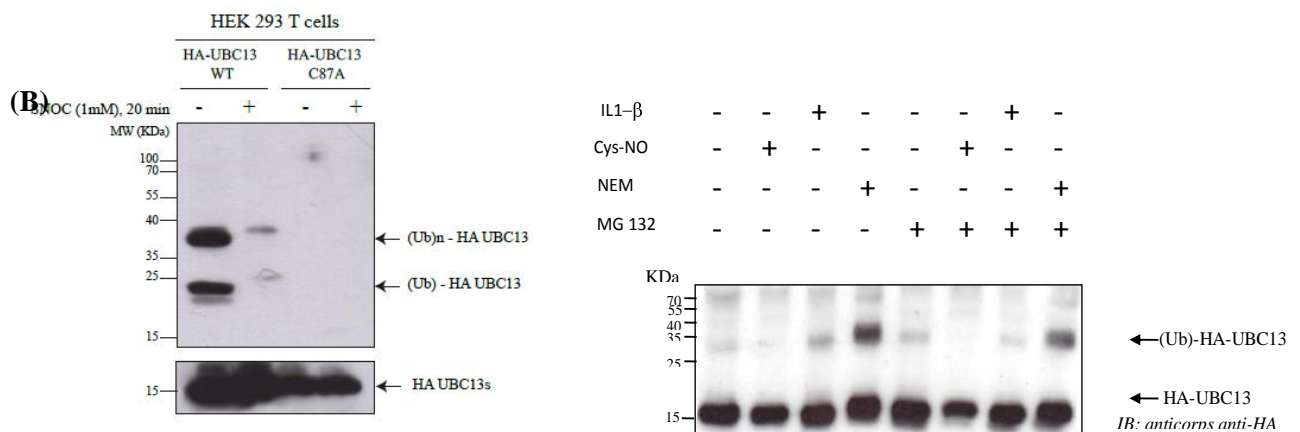
### 3. Le NO affecte l'ubiquitination d'Ubc13 par S-nitrosylation

Pour démontrer si le NO affecte ou pas l'ubiquitination d'Ubc13, les cellules 293T sont transfectées de manière transitoire par un plasmide contenant la forme sauvage de l'enzyme (taggée HA) et sont ensuite traitées ou non avec un donneur de NO (CysNO). L'ubiquitination d'Ubc13 est détectée par western blot après immunoprécipitation de l'enzyme (utilisant un anticorps anti-ubiquitine) et révélation avec un anticorps anti-HA. Les résultats de la figure 30A montrent que dans les cellules 293T, Ubc13 est mono- et poly-ubiquitinée. Cette modification post-traductionnelle est fortement inhibée dans les cellules traitées par le donneur de NO (CysNO).

Cet effet ne semble pas être un défaut dans l'expression de la protéine puisque le contrôle de charge (atteste de l'expression totale d'Ubc13) est similaire dans les cellules traitées ou non (Figure 30A).

Pour montrer que c'est la S-nitrosylation qui est responsable de cette diminution, la même expérience a été faite dans des cellules qui expriment la forme mutée d'Ubc13 (non nitrosylable). Les résultats obtenus montrent que cette forme est complètement résistante à l'ubiquitination (Figure 30A).

Il est connu que l'ubiquitination d'Ubc13 est impliquée dans la signalisation cellulaire. Nous avons donc vérifié si cette modification post-traductionnelle est impliquée dans la signalisation cellulaire ou dans la dégradation protéique dépendante du protéasome. Pour ce faire, les cellules 293T exprimant la forme sauvage de l'enzyme sont traitées par deux agents connus pour induire l'ubiquitination d'Ubc13 à savoir le  $\text{TNF}\alpha$  et le N-éthylmaleimide (NEM, un inhibiteur des déubiquitinases) en présence ou en l'absence de MG-132 (un puissant inhibiteur de l'ubiquitination) et/ou de CysNO. Les résultats montrent que l'ubiquitination d'Ubc13, qui est toujours diminuée par le NO, n'est pas modifiée en présence du MG-132, ce qui suggère que l'ubiquitination d'Ubc13 n'adresse pas ces protéines cibles à leur dégradation par le protéasome mais est bien impliquée dans la signalisation cellulaire. (Figure 30B).

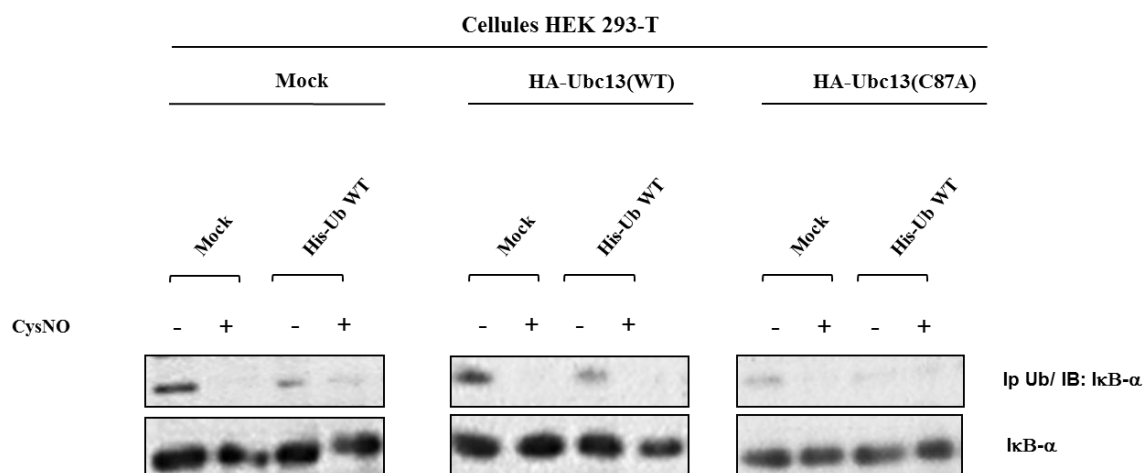


**Figure 30:** Ubiquitination d'Ubc13. (A) Les cellules HEK -293T ont été transfectées avec les constructions HA-UBC13 WT ou HA-UBC13 C87A puis traitées par la CysNO à la concentration de 1 M pendant 20 minutes. Les lysats cellulaires sont ensuite immunoprécipités avec un anticorps anti-ubiquitine puis analysés par western blot avec un anticorps anti-HA. (B) Les cellules HEK -293T ont été transfectées avec la construction HA-UBC13 WT puis stimulées par l'IL1- $\beta$  à 100 nM pendant 20 minutes ou traitées par la CysNO à la concentration de 1 mM pendant 20 minutes. Puis les lysats cellulaires sont analysés par western blot avec un anticorps anti-HA.

#### 4. La S-nitrosylation d'Ubc13 affecte sa capacité à ubiquitiner ses cibles

Nous avons choisi trois cibles d'Ubc13 à étudier : IK $\beta$ - $\alpha$ , TRAF6 et RIP. Pour ce faire, nous avons co-transfecté des cellules EMT-6H avec des plasmides permettant l'expression de la forme sauvage ou mutée d'Ubc13 et de l'ubiquitine. La détection de l'ubiquitination des différentes protéines cibles d'Ubc13 a été obtenue après immunoprécipitation de l'ubiquitine suivie d'une révélation de la protéine étudiée avec un anticorps spécifique. La figure 31 montre que le NO inhibe l'ubiquitination de IK $\beta$ - $\alpha$  dans les cellules non transfectées ou surexprimant la forme sauvage d'Ubc13. Cet effet est similaire à celui des cellules exprimant la forme mutée d'Ubc13 sur la cystéine 87. Aucune modification significative sur l'expression d'IK $\beta$  n'est observée ce qui suggère un effet de la S-nitrosylation sur la stabilisation de la protéine et qui aurait pour conséquence d'inhiber l'activité NF- $\kappa$ B. Il est rapporté que le NO inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B par sa capacité à S-nitrosyler les 2 sous-unités, p50 et p65 (DelaTorre et al. 1997); (Kelleher et al. 2007). Nos résultats suggèrent une autre manière de réguler NF- $\kappa$ B par l'inhibition par le NO de l'activité Ubc13 et l'ubiquitination d'IK $\beta$  alpha.

D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Nous n'avons pas réussi à obtenir des résultats interprétables concernant les deux autres cibles d'Ubc13. Une mise au point est nécessaire pour optimiser la détection de l'ubiquitination de TRAF6 et RIP.



**Figure 31 :** L'activité d'ubiquitination d'Ubc13 est inhibée par la S-nitrosylation. *Les cellules HEK -293T ont été transfectées avec les constructions HA-UBC13 WT ou HA-UBC13 C87A puis traitées par la CysNO à la concentration de 1 M pendant 20 minutes. Les lysats cellulaires sont ensuite immunoprécipités avec un anticorps anti-ubiquitine puis analysés par western blot avec un anticorps anti-IκB-α. L'ajout d'un donneur de NO, capable de S-nitrosyler Ubc13, inhibe l'ubiquitination de sa cible IκB-α. Cet effet est mimé dans les cellules exprimant la forme Ubc13-C87A.*

## 5. Implication d'Ubc13 dans l'effet cytotoxique du lipide A/IFN $\gamma$ ou d'un donneur de NO

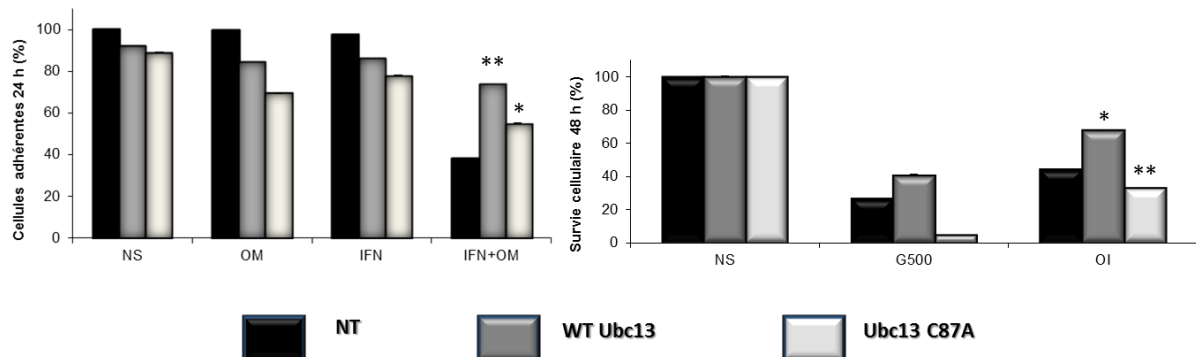
Du fait qu'Ubc13 est impliquée dans prolifération et la survie cellulaire, notre hypothèse est que l'inhibition de son activité comme on vient de le montrer précédemment par le NO devrait contribuer à l'effet cytotoxique du lipide A/IFN $\gamma$ . Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'impact de l'expression de la forme sauvage ou de la forme mutée de cette enzyme dans les cellules EMT-6H traitées ou non par la combinaison lipide A/IFN $\gamma$  ou par un donneur de NO, le GTN. La figure 6 montre que la cytotoxicité de la combinaison ou du GTN, mesurée par un test d'adhérence au bleu de méthylène ou par un test de prolifération au MTS, est réduite dans les cellules exprimant la forme sauvage d'Ubc13. En revanche, les cellules exprimant la forme mutée semblent être plus sensibles à l'effet cytotoxique de la combinaison (figure 32A).



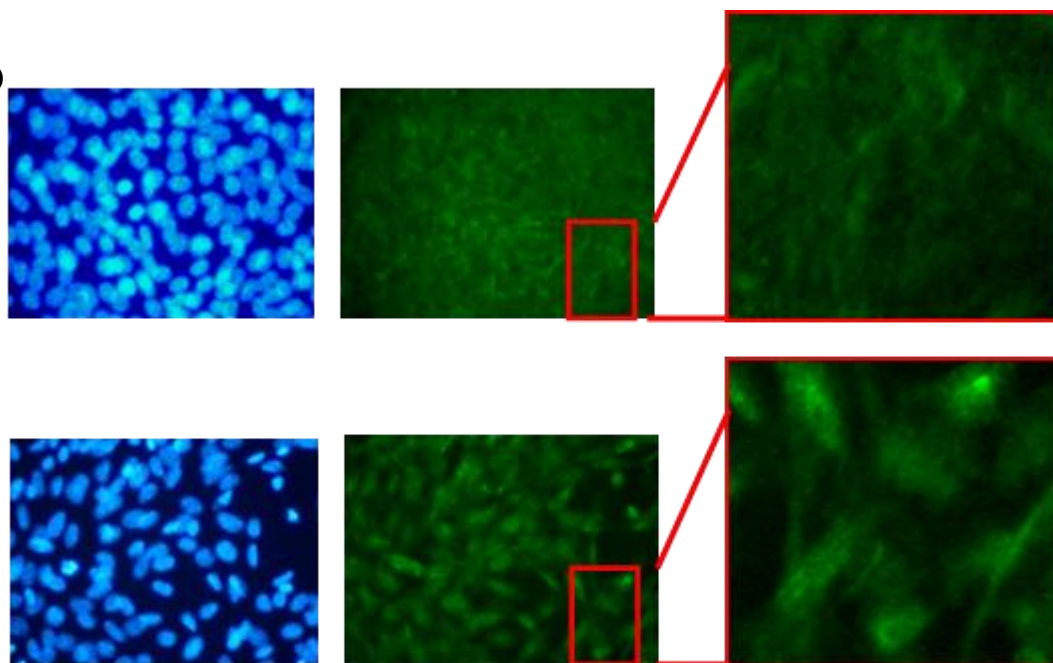
Ces effets semblent être modestes, cela pourrait être expliqué par le faible pourcentage des cellules transfectées par Ubc13 qui est environ de 30 % (résultats non montrés). Une optimisation de la transfection transitoire ou la génération de clones qui expriment de manière stable les formes sauvages et mutées d'Ubc13 peut améliorer les effets cytotoxiques observés. Une autre manière d'étudier l'implication d'Ubc13 dans l'effet cytotoxique de la combinaison est l'utilisation la stratégie de l'invalidation génique par si ou shRNA d'Ubc13 dans les cellules EMT-6H et d'en analyser les conséquences sur la sensibilité des cellules. Parallèlement à cette analyse, nous avons regardé la localisation subcellulaire d'Ubc13 puisqu'il est connu que cette enzyme se relocalise au noyau suite à un stress cellulaire ou un dommage à l'ADN. Nous avons observé que le lipide A/IFN $\gamma$  induit une relocalisation d'Ubc13 du cytosol vers le noyau (Figure 32B). Nous n'avons pas encore déterminé si cet effet est lié à sa S-nitrosylation ou à un autre processus qui restera à identifier.

Afin de finaliser ce travail, il nous reste à confirmer *in vivo* l'activité anti-tumorale du lipide A dans des souris porteuses de tumeurs exprimant la forme non nitrosylable d'Ubc13. Les cellules EMT-6H exprimant de façon stable la forme mutée d'Ubc13 seront injectées à des souris Balb/c par voie intraveineuse. Nous évaluerons la survie des souris après traitement par le lipide A.

(A)



(B)



**Figure 32 :** Analyse de l'activité cytotoxique du NO. (A) Analyse de l'expression d'Ubc13 après traitement par un donneur de NO. Les cellules EMT-6H ont été transfectées ou non par les formes WT-Ubc13 et Ubc13 C87A puis ont été traitées par un donneur endogène de NO (GTN) pendant 24h et par la combinaison OM-174/IFN $\gamma$  (OI) pendant 48h. Les cellules ont été lysées, puis l'expression d'Ubc13 a été analysée par western blot et le pourcentage de cellules vivantes a été analysé par un test d'adhérence au bleu de méthylène et par un test de survie au MTS. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type d'au moins trois expériences indépendantes. Les groupes appariés ont été comparés avec le test t de Student. Valeur  $P < 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif. Ainsi, \* représente une valeur de  $p < 0,05$ , \*\* représente une valeur de  $P < 0,005$ . (B) Analyse de la localisation cellulaire d'Ubc13. Les cellules EMT-6H ont été traitées par la combinaison lipide A + IFN $\gamma$

*pendant 24h puis la localisation de la protéine UBC13 a été mise en évidence par marquage en immunofluorescence.*

### **III. Matériels et méthodes**

#### *Culture cellulaire*

La lignée cellulaire cancéreuse mammaire murine EMT-6 provenant d'une tumeur du sein apparue spontanément chez la souris BALB/c est utilisée. Par injection dans la veine caudale, elles induisent des nodules pulmonaires chez ces mêmes souris. La lignée EMT-6 a pour la première fois été établie en culture par Rockwell *et al.* (Rockwell et al. 1972). Les clones EMT-6H et EMT-6J ont été obtenus par dilutions limites et sélectionnés suivant leur production de NO en réponse à l'IL-1 $\beta$ . Le clone cellulaire EMT6-J répond fortement à l'IL-1 $\beta$  en exprimant fortement la NOS II et est peu tumorigène alors que le clone EMT-6H répond faiblement à l'IL-1 $\beta$ , exprime peu la NOS II et est très tumorigène. C'est ce clone qui va m'intéresser dans ce travail puisqu'il induit la formation de nodules pulmonaires lorsqu'il est injecté dans la veine caudale de souris Balb/c.

Les cellules EMT-6H sont mises en culture à 37 °C sous atmosphère sèche sans CO<sub>2</sub> dans un milieu complet, composé de milieu EMEM (Eagle's minimum essential medium, Biowhittaker, Fontenay-sous-bois, France) auquel est ajouté 10% de sérum de veau fœtal « endotoxins free » (SVF) (Biowest, Nuaille, France) et 1% de glutamine 2 mM (Biowhittaker). Les cellules sont détachées du support plastique tous les 2-3 jours à l'aide d'un mélange d'EDTA 5  $\mu$ M (acide éthylène diamine tétra-acétique, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et de trypsine à 0,005% (Biowhittaker) après avoir été rincées avec de l'HBSS (Hank's balanced salt solution, Biowhittaker). Les cellules sont ensuite reprises avec du milieu complet, le sérum de veau fœtal ayant pour effet de bloquer l'action de la trypsine. Elles sont ensuite centrifugées et réensemencées à la concentration voulue. De façon générale, les cellules sont cultivées 24 h avant chaque traitement.

La lignée de cellules cancéreuses coliques SW480 humaine a été obtenue auprès de American Tissue Culture Collection (Manassas, VA) et a été cultivée dans un mélange 1:1 (vol / vol) de milieu de Eagle modifié par Dulbecco et Ham F-10 (Biowittaker, Fontenay-Sous-Bois, France) complété avec 10% de sérum de veau fœtal 1% de L-glutamine à 37 ° C en atmosphère sèche.

La lignée humaine de rein embryonnaire (HEK293T) a été maintenue dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Mediatech) avec 10% de FBS, dans une atmosphère humide (5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'air).

Chaque semaine, toutes les cultures sont testées pour déterminer une éventuelle contamination par des mycoplasmes avec le kit mycotect (Life Technologies, Cergy Pontoise, France).

### *Transfections*

Les constructions Ubc13 mutantes de type sauvage (WT) et C87A marquées par l'hémagglutinine (HA), ont été générées par sous-clonage d'UBC13 humain dans un plasmide pEF-HA en utilisant BamHI et a été gracieusement fourni par le laboratoire de Ze'v Ronai. La technique au phosphate de calcium a été utilisée pour la transfection transitoire des cellules EMT6-H, SW480 et 293T avec les différents plasmides. Brièvement, 5 µg de plasmide a été mélangé avec 500 µL de H<sub>2</sub>O et 60 µL de CaCl<sub>2</sub> (2,5 mol.L<sup>-1</sup>) puis le mélange a été incubé avec les cellules pendant 16 heures, après quoi les cellules ont été lavées avec une solution saline (PBS) et incubées dans un milieu de culture complet. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été traitées par un donneur de monoxyde d'azote (NO) à l'obscurité.

### *Traitements des cellules EMT-6H*

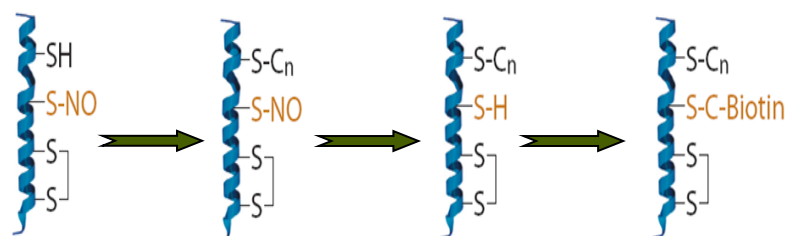
Les cellules EMT-6H sontensemencées à une concentration de  $1.10^4$  cellules par puits de plaques 96 puits et  $5.10^5$  cellules par puits de plaques 6 puits. Après 24 heures de culture, les cellules sont traitées avec de l'OM-174 à 500 ng/mL (OM Pharma, Meyrin, Suisse) associé ou non à l'IFN $\gamma$  à 33 ng/mL (interféron  $\gamma$ , Peprotech Inc., Le Perray en Yvelines, France). Cette combinaison induit l'expression de la NOS II et la production de monoxyde d'azote. Les cellules SW480 et 293T sont traitées par du glycéryltrinitrate à 500 µM pendant 24h. Chacune des lignées est traitée par une solution de L-cystéine-NO.

Toutes les solutions de prétraitements et de traitements sont réalisées dans du milieu de culture complet.

### *Purification de protéines S-nitrosylées par la technique du Biotine Switch Assay (BSA)*

Après traitement des cellules, le culot cellulaire est incubé avec 1 ml d'une solution de lyse non dénaturante (50 mM Tris-HCl, pH7.4, 300 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1 mM neocuproïne et 1% Triton X-100, en présence d'inhibiteurs de protéases). Les protéines sont alors dosées par la technique de Lowry.

Cinq milligrammes de protéines diluées dans le tampon de lyse (à raison de 0.5 mg/ml), sont incubés avec 4 volumes d'une solution de blocage (225 mM Hepes, pH 7.7, 0.9 mM EDTA, 90  $\mu$ M neocuproines, 2.5% SDS et 20 mM méthylmethanethiosulfonate [MMTS]), pendant 20 min à 50°C et sous agitation forte, afin de bloquer les groupes thiols libres (fig.2). Les protéines sont alors précipitées deux fois par ajout de deux volumes d'acétone glacée, incubées à 20°C pendant 15 min et centrifugées à 2000 g pendant 5 min à 4°C. Le culot protéique obtenu est repris dans 1 ml de tampon HENS (250 mM Hepes, pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproïne et 1% SDS) et incubé avec 1 mM d'acide L-ascorbique et 1 mM de biotine-HPDP réactive (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois) sous rotation. Après 1 heure, les protéines sont précipitées deux fois avec de l'acétone glacée et le culot est repris dans 1 ml de tampon HENS plus deux volumes d'un tampon de neutralisation (20 mM Hepes, pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100). Un échantillon est prélevé pour valider la manipulation par western blot. Les groupements thiols biotinylés avec la biotine-HPDP sont ensuite purifiés à l'aide de billes de neutravidine-agarose (préalablement équilibrés dans un tampon contenant 20 mM Hepes, pH 7.7, 100 mM NaCl et 1 mM EDTA) pendant 1h sous rotation. Après 5 lavages avec un tampon contenant 20 mM Hepes, pH 7.7, 600 mM NaCl, 1 mM EDTA et 0.5% EDTA, les protéines S-nitrosylées sont adressées à la plateforme protéomique de l'IFR-100.



**Remplacement d'une liaison S-NO par une liaison S-biotine**

**Figure 33 :** Principe du « Biotine Switch Assay » (« BSA ») consiste à remplacer la liaison S-nitrosylé par une liaison biotinylé.

*Tampon de lyse*

Tris HCl pH 7.4 50 mM  
NaCl 300 mM  
EDTA 5 mM  
Neocuproine 0.1mM  
Triton 1% : 1 ml  
H<sub>2</sub>O

*Tampon de neutralisation*

Hepes 20 mM pH 7.7  
NaCl 100 mM  
EDTA 1 mM  
Triton X-100 0.5%  
H<sub>2</sub>O

*Tampon d'équilibration*

Hepes 20 mM pH 7.7  
NaCl 100 mM  
EDTA 1mM  
H<sub>2</sub>O

*Tampon HEN:*

Hepes pH 7.7 250 mM  
EDTA 1 mM  
Neocuproine 0.1 mM  
H<sub>2</sub>O

*Tampon de lavage*

Hepes 20 mM pH 7.7  
NaCl 600 mM  
EDTA 1 mM  
Triton X100 0.5%  
H<sub>2</sub>O

*Tampon de saturation à préparer extemporanément*

Hepes 225 mM pH 7.7  
EDTA 1 mM  
Neocuproine 90µM  
SDS 2.5 %  
MMTS 20 mM  
H<sub>2</sub>O

*Acide L-ascorbique*

100 mM dans H<sub>2</sub>O

*Tampon HENS :*

HEN + 1% SDS

*Tampon de charge 2X :*

Glycerol 20 %  
β-mercaptoethanol 10 %  
SDS 4,6%  
Tris-HCl pH 6.8 0.125 mM  
bleu de bromophénol 0,1%

## *Détection des protéines par Western-Blot*

### Extraits cellulaires

5.10<sup>5</sup> cellules EMT-6H sont utilisées par condition de traitement. Les cellules sont décollées dans du PBS 1X froid à l'aide d'un grattoir puis sont transférées dans un tube et centrifugées (500 g/ 3 min/ 4 °C). Le culot cellulaire est repris dans 100 µl de tampon de lyse préparé extemporanément (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 10 mM ; NaCl 50 mM ; Na<sub>4</sub>PO<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 15 mM ; NaF 5 mM ; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 150 mM pH 10; EDTA 5 mM ; Triton X-100 1 % ; cocktail d'inhibiteurs de protéase 1 X), puis incubé 15 minutes dans la glace et enfin centrifugé (10 000 g/ 5 min / 4 °C). Le contenu en protéines du lysat est dosé à l'aide du kit *DC protein assay* (Biorad, Yvry-sur Seine, France). Après dosage, les extraits protéiques sont repris (V/V) dans du tampon Laemmli 2X (Glycerol 20 %, β-mercaptoethanol 10 %, SDS 4,6%, Tris-HCl pH 6.8 0,125 mM, bleu de bromophénol 0,1%), chauffés à 95°C pendant 5 min. Les extraits protéiques sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

### Migration-transfert

Cinquante microgrammes d'extraits protéiques sont séparés sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE composé de 2 parties : gel de charge et gel de séparation. La migration des protéines s'effectue sous l'action d'un champ électrique de 90 V dans du tampon de migration (Tris-HCl 2,5 mM pH 8,8, Glycine 15,2 mM).

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) par la technique du transfert en milieu liquide (Tris-HCl 0,15 M ; Acide borique 0,05 M) à l'aide du dispositif de Trans-blot (Biorad). Le transfert s'effectue sous l'action d'un champ électrique de 50 V pendant 1 heure 30 min.

### Immunodétection

La membrane est ensuite saturée 1 h à température ambiante dans une solution de PBS, Tween-20 0,1% (PBS-T) contenant 8 % de lait écrémé en poudre (Régilait).

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps polyclonal anti-HA de rat (Transduction Laboratory, KY, USA), anti-Ubc13 polyclonal de lapin (cell signaling technology),

anti-Ubiquitine (clone P4D1) monoclonal de lapin, anti-I $\kappa$ Ba monoclonal de lapin dilué au 1/5 000 dans du PBS-T pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation. Ensuite la membrane est lavée 3 fois 10 min avec du PBS-T, puis incubée avec l'anticorps polyclonal de chèvre anti-lapin ou chèvre anti-rat couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, WG, USA) dilué au 1/10 000 dans du PBS-T. Après 30 min d'incubation, la membrane est lavée 3 fois 10 min avant d'être révélée par chimioluminescence à l'aide du kit « ECL » (Amersham, UK) sur des Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL (Amersham, UK).

### *Analyse par spectrométrie de masse*

Les protéines de chaque échantillon ont été éluées des billes par chauffage à 95 ° C pendant 5 min dans un tampon dénaturant contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol ( $\beta$ -mercaptoéthanol 10%, SDS 4,6%, M TrisHCl 0,125 pH 7,4). Les billes ont été sédimentées et le surnageant a été récupéré pour précipiter les protéines (acide trichloracétique 15% / acétone). Les culots protéiques ont été repris dans 10  $\mu$ l de tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> à 100 mM. Les protéines ont ensuite été réduites (dans 10 mM PTCE, NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> solution), alkylées (en 55 mM iodoacetamide, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> solution) et digérées par la trypsine (trypsine for Mass Spectrometry, Promega, France). Les produits de digestion ont ensuite été purifiés et concentrés sur pointe C18. Les éluats C18 sont séparés en nanoLC et fractionnés en plaque MALDI. Chaque fraction a été analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF en MS et MS / MS sur ultrafleXtreme (BrukerDaltonics), en mode automatique via le WARP-LC. Une protéine standard (sérum albumine de rat RSA) a été digérée dans des échantillons parallèles pour valider l'étape de digestion. Après digestion, un dépôt et une analyse par spectrométrie de masse sont effectués pour vérifier la présence des peptides dans les échantillons. Un contrôle correspondant à un digest de BSA commercial est également injecté sur la nanoLC avant le passage des échantillons. Ce contrôle est également analysé par spectrométrie de masse pour valider l'étape de séparation et d'analyse.



### *Marquage d'Ubc13 intracellulaire par immunofluorescence*

Les cellules ( $2,5 \cdot 10^3$ ) sont ensemencées sur des lamelles en verre sphériques de 12 mm de diamètre (Marienfeld; VWR) dans une plaque 24 puits. Ces cellules sont incubées avec différents traitements pendant 48 h. Les cellules sont rincées au PBS puis fixées par ajout de méthanol glacé ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) pendant 2 min 30 puis rincées rapidement avec de l'acétone froide ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) le – doit être mis à côté du 20. Elles sont ensuite séchées puis réhydratées avec du PBS. Les sites non spécifiques sont bloqués avec du PBS contenant 0,1 % de sérum albumine bovine (BSA) pendant 20 min. Les cellules sont ensuite incubées 1h à température ambiante en présence de l'anticorps monoclonal de lapin anti-Ubc13 dilué au 1/300 dans du PBS à 0,1 % de BSA. Après deux lavages de 5 min avec du PBS, les cellules sont incubées 1 heure avec l'anticorps de chèvre anti-lapin couplé au FITC dilué au 1/1 000 dans du PBS à 0,1 % de BSA puis rincées 3 fois pendant 5 min avec du PBS. Les lamelles contenant les cellules marquées sont ensuite montées sur des lames dans 5  $\mu\text{L}$  de milieu de montage (Fluorsafe<sup>TM</sup> Reagent, Calbiochem) permettant de limiter l'extinction de fluorescence. Des Immunoglobulines non pertinentes du même isotype ont été utilisées comme control négatif. Les lames sont ensuite conservées à  $4^{\circ}\text{C}$  et à l'obscurité jusqu'à observation. Les images sont acquises pour un même temps d'exposition par microscopie à épifluorescence (Nikon Eclipse E600, Champigny, France).

### *Immunoprécipitation et immunoblotting.*

Les cellules ( $50$  à  $100 \cdot 10^6$  par condition) sont implantées dans des flacons de culture de  $175\text{ cm}^2$  (Nunc, Roskilde, Danemark). Le lendemain les cellules sont transfectées par la technique au phosphate de calcium avec les plasmides tagger HA, codant les formes sauvages et mutantes sur la cystéine 87 d'Ubc13. Après 24h de transfection, les cellules sont stimulées par la combinaison OM-174/ $\text{IFN}\gamma$  ou traitées par un donneur de NO. Les flacons sont posés sur la glace et les cellules grattées et rincées 2 fois par du PBS1X froid à l'obscurité. Les cellules sont lysées dans 1 mL de tampon de lyse pendant 30 minutes, puis le lysat est centrifugé à  $15\,000\text{g}$  pendant 20 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentration en protéines est dosée à l'aide du kit DC

*Proteinassay* (Biorad). Les lysats sont ajustés à la même concentration protéique avec du tampon de lyse. Les lysats sont ensuite incubés trois fois avec 40 µL de billes de protéines A/G-sépharose (Amersham Biosciences, Les Ullis, France) diluées dans du tampon de lyse (volume à volume) pendant 45 min sur une roue en chambre froide. Après centrifugation (500g, 2min), le lysat est incubé une nuit à 4°C sur une roue avec 2,5 µg d'anticorps anti-HA ou anti-ubiquitine ou anti-Ubc13, ou anti-IκBa. Le lendemain, 40 µL de protéines A/G-sépharose diluées sont alors ajoutées et incubées pendant 90 min sur une roue en chambre froide. Les billes sont ensuite lavées 5 fois avec 1 mL de tampon de lyse et les immunocomplexes sont dissociés par chauffage à 95°C pendant 10 min dans 30 µl de tampon de charge. Les échantillons sont ensuite analysés par western blot.

*Tampon de lyse :*

Tris-HCl, pH 7,4 20 mM  
NaCl 150 mM  
NP-40 1%  
Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM  
Glycerol 10 %  
Inhibiteurs de protéases 1X

*Tampon de charge 2X :*

Glycerol 20 %  
β-mercaptoethanol 10 %  
SDS 4,6%  
Tris-HCl pH 6.8 0.125 mM  
Bleu de bromophénol 0,1%

*Statistiques*

Les données sont présentées en moyenne ± écart-type du nombre indiqué d'expériences. Des différences significatives ont été estimées par une analyse de variance suivie par le test t de Student.

## Chapitre III : discussion

L'activité antitumorale du lipide A (OM-174), qu'on a déjà démontré dans deux modèles de cancers, un cancer de colon du rat (Onier et al, 1999) et un mélanome de souris (Gautier et al, 2010), a été confirmé dans ce modèle de cancer mammaire de souris, EMT-6H. Ces résultats montrent que l'effet du lipide A n'est pas restreint à un type de cancers et ne dépend pas du modèle expérimental. Il faut noter que cette activité antitumorale a été observée avec d'autres lipide A tels que le DT-5461 et l'ONO-4007 (pour revue : Reisser et Jeannin, 2009)

Cette conclusion est renforcée par des résultats obtenus dans un essai clinique de phase I avec ce lipide A, où il a été montré que cette molécule est active sur des patients atteints de différents types de cancers (cancer du colon, du sein, du poumon, des ovaires), en terme de production de cytokines inflammatoires ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL1-}\beta$ ) et d'augmentation du nombre de certaines cellules immunitaires (cellules dendritiques, lymphocytes T infiltrant). Quant à l'effet antitumoral du lipide A chez ces patients il reste à déterminer, puisque lors de cet essai la dose maximale tolérée n'a pas été atteinte (Isambert et al, 2013).

L'étude des mécanismes moléculaires à l'origine de l'activité antitumorale de l'OM-174 nous a conduits à identifier 3 acteurs principaux qui participent à cet effet : le TLR4, l' $\text{IFN}\gamma$  et la NOS II.

### 1. Implication du TLR4 de la cellule cancéreuse et de l'hôte.

Nos résultats montrent que l'activité antitumorale du lipide A évaluée chez la souris est dépendante du TLR4 de la souris et de la cellule cancéreuse.

En effet, l'efficacité du lipide A est fortement affectée dans des souris invalidées pour TLR4 ou greffées avec des cellules EMT-6H dans lesquelles l'expression de TLR4 est réduite. Des résultats supplémentaires nous permettent de faire l'hypothèse qu'un autre récepteur aux LPS, TLR2, pourrait également participer à cet effet anti-tumoral. En effet, des résultats *in vitro* montrent que l'invalidation de TLR2 (shRNA) dans les cellules EMT-6H inhibe la signalisation du lipide A à savoir l'induction de l'expression de la NOS II et la production de NO (résultats : voir annexe) (Garay et al. 2007).

Nos données sont en accord avec d'autres travaux qui montrent l'implication du TLR4 dans la réponse antitumorale. En effet, l'équipe de Laurence Zitvogel, (IGR, Villejuif) a montré que certains médicaments anticancéreux de la famille des anthracyclines, par exemple, induisent une mort cellulaire des cellules cancéreuses libérant HMGB1, un agoniste de TLR4 et TLR2. Ce ligand va ainsi activer les cellules dendritiques et permettre la cross-présentation des antigènes tumoraux conduisant à une réponse T cytotoxique antitumorale (Apetoh et al, 2007). Si dans ce travail, la cellule dendritique a été identifiée comme étant la cible de l'agoniste de TLR4, nous avons des arguments assez solides pour penser que les neutrophiles participent à l'effet antitumoral du lipide A. Dans un travail en 'review', nous avons montré que l'inhibition du recrutement des neutrophiles et de leur activation au sein de tumeurs de cancer de colon affecte fortement l'efficacité de l'OM-174 (Martin et al, soumis). Cependant, l'implication d'autres cellules comme les DC, les macrophages et les NK reste d'actualité. Concernant ces dernières, on a montré dans un essai clinique de phase I que le traitement de patients atteints de cancer par l'OM-174 active et augmente le nombre des cellules NK chez certains patients (Isambert et al, 2013). Récemment, plusieurs travaux ont montré le rôle protecteur et antitumoral du TLR4. Il a été montré, par exemple, que la présence du TLR4 réduisait l'infiltrat de cellules inflammatoires et le développement de tumeurs après un traitement par un carcinogène (Bauerle et al. 2005).

Dans un second travail, les auteurs montrent que des souris C3H/HeJ qui ont une mutation dans le domaine intracellulaire du TLR4 développent plus de tumeurs que les souris

sauvages lorsqu'elles sont traitées par un carcinogène (Yusuf et al. 2008). Plus récemment, il a été montré que l'inactivation de TLR4 dans des souris augmente la prise de tumeurs de cancer mammaire, le nombre des métastases et diminue la survie des souris (Ahmed et al. 2012). De même, en utilisant une autre stratégie, il a été montré que l'activation constitutive de TLR4 dans des souris APC (Min/+)° (des souris qui développent spontanément des adénomes coliques) provoque une régression tumorale liée à l'induction d'une mort apoptotique massive des cellules tumorales (Li Y et al, 2013).

Chez l'homme, le rôle du TLR4 dans le cancer a été regardé à travers l'impact d'un polymorphisme du TLR4 humain qui est responsable du remplacement d'un acide aspartique par une glycine extracellulaire de la protéine (TLR4Asp299Gly), polymorphisme trouvé être responsable à une moindre réponse aux LPS. L'équipe de Laurence Zitvogel a montré que chez des patientes porteuses de cancer du sein et traitées par des anthracyclines et de la radiothérapie, le polymorphisme Asp299Gly du TLR4 était un facteur de mauvais pronostic en ce qui concerne la réponse au traitement (Apetoh et al, 2007). Il a été également montré que des individus porteurs du polymorphisme du TLR4 ont un risque significativement plus important de développer un cancer de l'estomac provoqué par une infection par *Helicobacter pylori* (Hold et al. 2007).

Nos résultats montrent en plus que le TLR4 exprimé par la cellule cancéreuse est également impliqué dans l'effet antitumoral du lipide A. Bien que ce résultat soit en accord avec certains travaux, il semble être en contradiction avec certaines données de la littérature qui montrent un lien entre l'expression du TLR4 et certains cancers incluant celui de l'ovaire, de la prostate et du cou. En effet, il a été montré que le TLR4 induit la prolifération et la chimiorésistance de cellules cancéreuses ovariennes (Kelly et al. 2006). De même, dans des lignées humaines de cancer de la prostate, le niveau d'expression de TLR4 est positivement corrélé au potentiel métastatique de ces lignées (Hua D, 2009). Des résultats similaires ont été obtenus dans le carcinome de la tête et du cou où l'intensité d'expression du TLR4 est corrélée au grade de la tumeur (Szajnik et al. 2009). La conclusion qu'on peut sortir de ces

résultats est que l'effet antitumoral du lipide A observé *in vivo* impliquerait le TLR4 de la cellule tumorale et des cellules de l'hôte.

Nous avons également montré *qu'in vivo* l'activité antitumorale du lipide A dépendrait de l'IFN $\gamma$  produit par la souris et également du récepteur de cette cytokine exprimé par les cellules tumorales. Est-ce que l'effet *in vivo* de l'IFN $\gamma$  est uniquement direct ou indirect ? Nous n'avons pas les arguments expérimentaux pour infirmer ou confirmer cette hypothèse. Cependant, selon nos connaissances, les cellules potentiellement sécrétrices d'IFN $\gamma$  après stimulation du TLR4 seraient les NK. Bien qu'on n'ait pas étudié l'implication de ces cellules dans l'effet antitumoral du lipide A, les résultats issus de l'essai clinique révèlent que le lipide A augmenterait le nombre des NK chez tous les patients recevant le lipide A. De plus, pour le dernier patient traité par la plus forte dose du lipide A, il a été mis en évidence une augmentation de l'activité cytotoxique de ces cellules. On peut se demander pourquoi cet essai n'a pas inclus plus de patients ? La réponse est que le lipide A préconisé pour cette étude était périmé et qu'il aurait fallu changer de lot (Isambert et al, 2013). Nous n'excluons pas non plus l'implication des lymphocytes T cytotoxiques, un acteur de la réponse immunitaire adaptative qui secrèteraient de l'IFN $\gamma$ . Cette réponse est induite par le lipide A puisque des souris guéries par le lipide A rejettent l'implantation des mêmes cellules cancéreuses.

Nos résultats confirment l'implication de la NOS II dans l'activité antitumorale du lipide A dans ce modèle de cancer mammaire après l'avoir montrée dans le cancer colique (Onier et al, 1999). En effet, l'efficacité antitumorale du lipide A est fortement réduite lorsque l'activité de la NOS II est inhibée chez la souris par l'ajout d'un inhibiteur spécifique à cette enzyme (1400W). La relation de la NOS II avec le cancer est largement débattue depuis plusieurs années. La majeure partie de la communauté scientifique associe l'expression et l'activité de la NOS II à la progression tumorale et à la résistance aux chimiothérapies (Gauthier et al., 2004).

Parmi les arguments avancés ceux qui montrent par exemple qu'une expression plus forte de la NOS II est observée dans plusieurs types de cancer incluant les poumons, le colon, le sein, le mélanome et le pancréas (pour revue : (Burke et al. 2013). Cette expression semble corrélée à un mauvais pronostic comme dans le cancer du sein n'exprimant pas le récepteur à l'œstrogène. Elle augmenterait également la capacité métastatique de certaines cellules cancéreuses (Shi et al. 2000). Quant à ceux qui lui confèrent un effet antitumoral et sensibilisateur à plusieurs agents cytotoxiques y compris certaines chimiothérapies (Huerta et al., 2008), ils avancent plusieurs données telles que des cellules cancéreuses du pancréas transfectées par la NOS II ne forment pas de tumeurs dans la souris (Lee X et al, 2005). Des cellules cancéreuses n'exprimant pas la NOS II montrent un haut niveau de prolifération, sont plus tumorigènes et métastatiques (Wei et al. 2003). Néanmoins, on dénombre plus de travaux qui montrent l'effet antitumoral de la NOS II que le contraire. D'après les données de la littérature, l'effet ambivalent de la NOS et du NO semble dépendre de plusieurs paramètres : du niveau d'activation de l'enzyme et donc du taux de NO, de la durée de l'exposition au NO, du statut redox environnant et de la nature des cibles moléculaires proximales au NO.

Il en sort de cette étude et d'une autre du laboratoire (Gauthier et al, 2004) que la NOS II peut avoir les deux fonctions pro et antitumorale mais que cela dépendrait du type cellulaire dans lequel elle est exprimée. On a montré que l'expression de la NOS II induite dans les cellules cancéreuses en réponse à l'OM-174 conditionne l'efficacité antitumorale de ce lipide A. En revanche, la NOS II de l'hôte n'affecte pas l'efficacité antitumorale du lipide A puisque cette activité n'est pas modifiée dans des souris invalidées pour le gène de la NOS II.

Par conséquent, on peut conclure que l'activité du lipide A OM-174 est liée à sa capacité à activer le TLR4 des cellules cancéreuses et des cellules immunitaires induisant la production d'IFN $\gamma$ , et que ces deux voies de signalisation vont activer dans les cellules cancéreuses, la NOS II qui serait à l'origine de la mort de ces cellules.

## 2. Mécanismes de cytotoxicité de la NOS II

Nos résultats montrent que le NO produit par la NOS II est nécessaire mais n'est pas suffisant pour induire un effet cytotoxique. En effet, des concentrations de NO produit par un donneur de NO, équivalentes à celles générées par la NOS II en réponse à la combinaison lipide A + IFN $\gamma$ , ne sont pas toxiques. Nos résultats montrent également que l'activité antitumorale du lipide A nécessite la production de l'anion superoxyde dont l'origine n'est pas la NADPH-oxydase (Nox), la principale source de superoxyde, mais plutôt la NOS II. La capacité de cette enzyme à produire des ROS, appelé découplage, est un événement rare qui est généralement associé à une diminution de la production de NO. Il ne se produit que dans des conditions de déplétion en son substrat, l'arginine ou en son co-facteur, le BH4 (Xia et al., 1998). Nous avons confirmé la diminution du taux intracellulaire de l'arginine après traitement des cellules cancéreuses avec le lipide A et l'IFN $\gamma$ . Cette diminution ne semble pas être liée à une augmentation de l'activité arginase, la deuxième voie impliquée dans le catabolisme de cet acide aminé à côté de celle de la NOS II. Notre hypothèse pour expliquer ce découplage, est que le taux élevé de la NOS II produit par le lipide A et l'IFN $\gamma$  induirait une utilisation accrue d'arginine, conduisant à une diminution de sa concentration intracellulaire non compensée par un apport extérieur, favorisant ainsi le découplage de l'enzyme. L'apport extérieur de l'arginine est assuré par l'intermédiaire d'une famille de protéines appelées transporteurs d'acides aminés cationiques (CAT) (il existe plusieurs isoformes) dont l'activité est inductible par des cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ) et de LPS. L'éventualité que la diminution intracellulaire de l'arginine pourrait être liée à un défaut dans la fonction des CAT provoquée par le lipide A et l'IFN $\gamma$  reste probable. Pour montrer si le lipide A et l'IFN $\gamma$  affectent ou pas la fonction des CAT, il faudrait mesurer le taux intracellulaire de l'arginine en utilisant de l'arginine marquée au tritium.

L'implication des CAT pourrait être évaluée en bloquant leur fonction par la L-leucine qui bloque la liaison de la L-arginine à ces récepteurs. Nos résultats montrent que la cytotoxicité



du lipide A et l'IFN $\gamma$  nécessite la présence de peroxynitrite, la résultante de l'interaction NO et superoxyde. La formation de ce radical, hautement cytotoxique, dépend beaucoup de la proximité des deux radicaux NO et superoxyde, un environnement établi par la NOS II qui produit les deux radicaux. Nos résultats ne montrent pas si la localisation subcellulaire de la NOS II et donc du peroxynitrite joue un rôle dans la cytotoxicité, puisque il est connu que le lieu de génération du NO ou du peroxynitrite dans la cellule conditionne la réponse cellulaire aux effecteurs cytotoxiques. Ceci peut être expliqué par le fait que les cibles du NO et du peroxynitrite ne sont pas les mêmes dans les différents compartiments de la cellule. A défaut de déterminer la localisation de la NOS II, nous avons analysé les cibles du NO et plus précisément identifier les protéines S-nitrosylées.

### **3. Effet de la S-nitrosylation sur la fonction de l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2, Ubc13.**

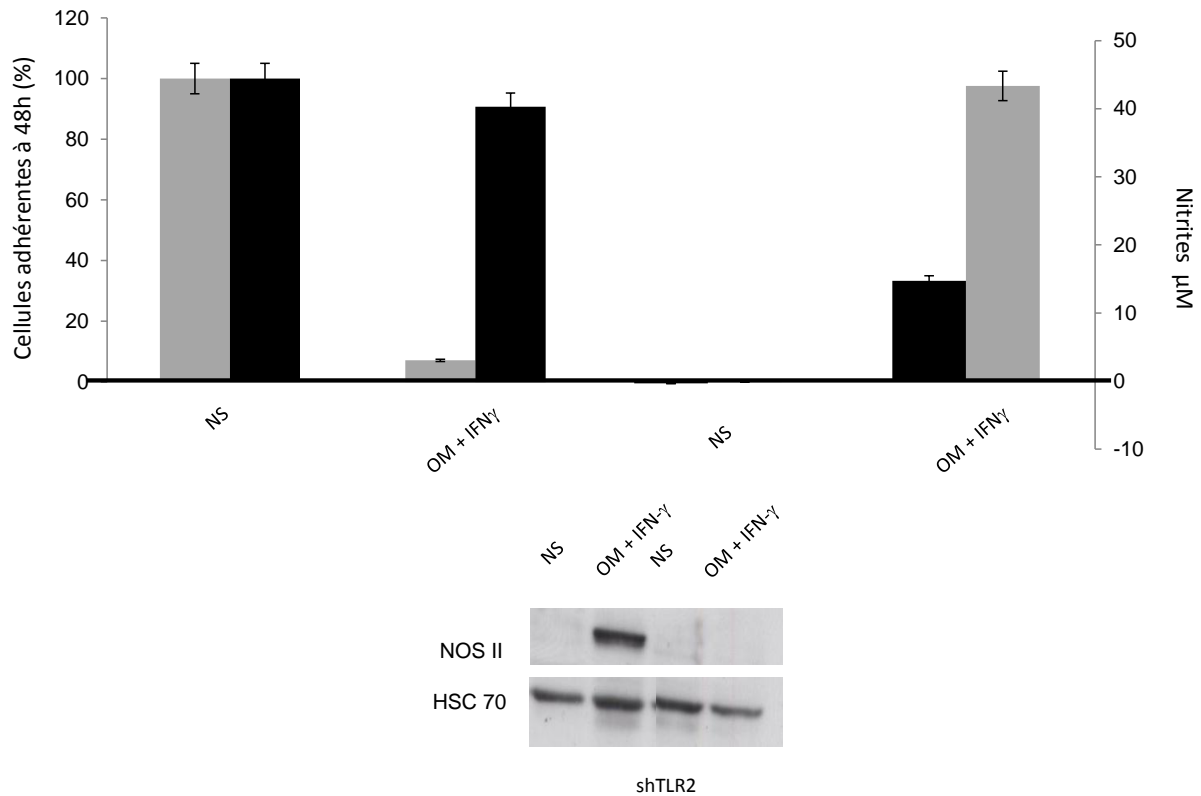
Une analyse protéomique par LC-MS/MS nous a permis d'identifier une dizaine de protéines S-nitrosylées à partir des cellules cancéreuses mammaires EMT-6H traitées par le lipide A et l'IFN $\gamma$ . Le faible nombre des cibles du NO est relativement surprenant mais pourrait être expliqué par le fait que comme la S-nitrosylation est un processus réversible (lié à la présence d'enzymes de dénitrification). L'analyse ne pourrait détecter que des protéines S-nitrosylées restant stables pendant au moins 24 h (le temps du traitement des cellules). Toutes les protéines dont la nitrosylation est très labile (quelques heures voire quelques minutes) ne peuvent donc pas être caractérisées (Stamler JS et al, Science. 1992) sans des cinétiques courtes de traitement, une procédure très lourde tant au niveau de la purification des protéines S-nitrosylées qu'au niveau de l'analyse protéomique. Certaines des protéines identifiées sont des protéines de structure comme l'actine et d'autres sont impliquées dans la prolifération cellulaire ou associées à l'immunité.

Parmi ces protéines, nous avons choisi d'analyser l'effet de la S-nitrosylation sur la fonction de l'enzyme de conjugaison E2 de l'ubiquitine, l'Ubc13 et son implication dans la

cytotoxicité induite par le lipide A et l'IFN $\gamma$ . Le choix de cette enzyme parmi les autres cibles du NO n'est pas fortuit, mais tient compte de l'importance des voies de signalisation de cette enzyme dans la prolifération cellulaire normale et cancéreuse (Boone DL, et al. Nat Immunol. 2004). Il est décrit que l'invalidation de l'expression du gène Ubc13 chez la souris cause un déficit drastique de plusieurs lignées hématologiques avec une atrophie du thymus et de la moelle osseuse (Wu X et al. PNAS. 2009.). Nous avons d'abord confirmé les résultats de l'analyse protéomique en prouvant que l'enzyme Ubc13 est bien S-nitrosylée dans les cellules EMT-6H suite à un traitement par le lipide A et IFN $\gamma$ . Cette modification se fait sur la cystéine 87, la seule cystéine de la protéine et qui se trouve au niveau du site actif de l'enzyme, puisque l'enzyme dont la cystéine 87 est remplacée par une alanine est résistante à la S-nitrosylation. Ce résultat indique qu'Ubc13 est la seconde protéine parmi les protéines de l'ubiquitination à être une cible du NO à côté de l'ubiquitine E1, la protéine qui transfère l'ubiquitine à une enzyme de conjugaison E2 (Kitagaki et al. 2009). Il a été montré que la S-nitrosylation de la E1 inhibe sa capacité à fixer l'ubiquitine, ce qui a pour conséquence de stabiliser l'expression de la p53 et d'induire l'apoptose (Kitagaki et al. 2009). Nous avons également montré que la S-nitrosylation d'Ubc13 affecte son autobiquitination, sa fonction d'ubiquitiner une de ses cibles, IkB $\alpha$ , et semble être impliquée dans la cytotoxicité du lipide A et de l'IFN $\gamma$ . Nous envisageons par la suite d'analyser une seconde cible d'Ubc13 impliquée dans la voie du TLR4, le récepteur du lipide A, la protéine TRAF6, une E3 ubiquitine ligase. Nos résultats indiquent pour la première fois que le NO, grâce à son pouvoir de nitrosylation inhibe la fonction d'Ubc13. Il faut noter que des récents efforts sont faits pour caractériser des inhibiteurs d'Ubc13 qui pourraient avoir un intérêt important dans le traitement de certaines affections inflammatoires et auto-immunes (Ardecky et al. 2013). Le fait qu'Ubc13 joue un rôle dans la réparation de l'ADN et l'activation de NF- $\kappa$ B induite par un dommage de l'ADN, son inhibition peut donc potentiellement être bénéfique dans une stratégie thérapeutique des cancers. Nous comptons vérifier cette hypothèse *in vivo* dans des souris porteuses de tumeurs exprimant la forme sauvage ou mutée sur la cystéine 87 d'Ubc13

et évaluer l'activité antitumorale du lipide A. Les analyses de cytotoxicité *in vitro* montrent que l'expression de la forme mutée d'Ubc13 sur sa cystéine 87 affecte sensiblement l'effet cytotoxique du lipide A et IFN $\gamma$ . Nos résultats mettent en évidence une nouvelle manière d'inhiber Ubc13 autres que par des agents chimiques qui, comme tout le monde le sait, ont dans la plupart du temps, des effets secondaires indésirables (nausées, vomissement, fièvre, desquamation, perte capillaire). L'utilisation de donneurs de NO tels que GTN (ou glycéryl trinitrate, un médicament largement utilisé dans le traitement de l'angine de poitrine) ou des agonistes de TLR4 tels que le lipide A synthétique, OM-174 (qui a montré son innocuité chez l'homme (Isambert et al. 2013)) peuvent constituer deux nouveaux outils dans l'élaboration de nouvelles stratégies pour inhiber Ubc13 dans des cellules cancéreuses, qui en expriment beaucoup et qui montrent des résistances aux thérapies standards, ce qui est le cas de certains cancers (Tauriello et al. 2010).

## ANNEXE



Inhibition de l'expression de la NOS II dans les cellules n'exprimant plus le TLR2 *Analyse de l'expression de la NOS II après 48h de traitement par la combinaison lipide A + IFN $\gamma$  dans les cellules EMT-6H transfectées avec un plasmide inhibant l'expression du récepteur TLR2. Les cellules ont été lysées, puis l'expression de la NOS II a été analysée par western blot et le pourcentage de cellules vivantes a été analysé par un test d'adhérence au bleu de méthylène. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type d'au moins trois expériences indépendantes. Les groupes appariés ont été comparés avec le test t de Student. Valeur  $P < 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif. Ainsi, \* représente une valeur de  $p < 0,05$ , \*\* représente une valeur de  $P < 0,005$ .*

## BIBLIOGRAPHIE

- Aaltoma, S. H., P. K. Lipponen, et al. (2001). "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer." Anticancer Res **21**(4B): 3101-3106.
- Abrams, J. (1991). "Interactions between organic nitrates and thiol groups." Am J Med **91**(3C): 106S-112S.
- Abrous-Anane, S., A. Savignoni, et al. (2011). "[Management of inflammatory breast cancer after neo-adjuvant chemotherapy]." Cancer Radiother **15**(8): 654-662.
- Adam, L., M. Bouvier, et al. (1999). "Nitric oxide modulates beta(2)-adrenergic receptor palmitoylation and signaling." J Biol Chem **274**(37): 26337-26343.
- Adhikari, A. and Z. J. Chen (2009). "Diversity of polyubiquitin chains." Dev Cell **16**(4): 485-486.
- Adib-Conquy, M. and J. M. Cavaillon (2002). "Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression." J Biol Chem **277**(31): 27927-27934.
- Ahern, G. P., V. A. Klyachko, et al. (2002). "cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO." Trends Neurosci **25**(10): 510-517.
- Ahmed, A., J. H. Wang, et al. (2012). "Silencing of TLR4 Increases Tumor Progression and Lung Metastasis in a Murine Model of Breast Cancer." Ann Surg Oncol.
- Akashi, S., Y. Nagai, et al. (2001). "Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition." Int Immunol **13**(12): 1595-1599.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Ambs, S., W. G. Merriam, et al. (1998). "p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells." Nat Med **4**(12): 1371-1376.
- Andersen, P. L., H. Zhou, et al. (2005). "Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A." J Cell Biol **170**(5): 745-755.
- Andreani, V., G. Gatti, et al. (2007). "Activation of Toll-like receptor 4 on tumor cells in vitro inhibits subsequent tumor growth in vivo." Cancer Res **67**(21): 10519-10527.

- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, et al. (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." Nat Med **13**(9): 1050-1059.
- Ardecky, R. J., K. Welsh, et al. (2013). "Design, synthesis and evaluation of inhibitor of apoptosis protein (IAP) antagonists that are highly selective for the BIR2 domain of XIAP." Bioorg Med Chem Lett **23**(14): 4253-4257.
- Aulak, K. S., M. Miyagi, et al. (2001). "Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12056-12061.
- Baker, T. L., M. A. Booden, et al. (2000). "S-Nitrosocysteine increases palmitate turnover on Ha-Ras in NIH 3T3 cells." J Biol Chem **275**(29): 22037-22047.
- Bauerle, T., H. Adwan, et al. (2005). "Characterization of a rat model with site-specific bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells and its application to the effects of an antibody against bone sialoprotein." Int J Cancer **115**(2): 177-186.
- Belvisi, M. G., D. Stretton, et al. (1991). "Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways." Eur J Pharmacol **198**(2-3): 219-221.
- Ben-Neriah, Y. and M. L. Schmitz (2004). "Of mice and men." EMBO Rep **5**(7): 668-673.
- Benhar, M., M. T. Forrester, et al. (2008). "Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins." Science **320**(5879): 1050-1054.
- Benhar, M., M. T. Forrester, et al. (2009). "Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(10): 721-732.
- Besson-Bard, A., A. Pugin, et al. (2008). "New insights into nitric oxide signaling in plants." Annu Rev Plant Biol **59**: 21-39.
- Blaise, G. A., D. Gauvin, et al. (2005). "Nitric oxide, cell signaling and cell death." Toxicology **208**(2): 177-192.
- Boesgaard, S. (1995). "Thiol compounds and organic nitrates." Dan Med Bull **42**(5): 473-484.
- Bogle, R. G., A. R. Baydoun, et al. (1992). "L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide." Biochem J **284** ( Pt 1): 15-18.
- Boje, K. M. and S. S. Lakhman (2000). "Nitric oxide redox species exert differential permeability effects on the blood-brain barrier." J Pharmacol Exp Ther **293**(2): 545-550.
- Bonavida, B. and S. Baritaki (2011). "The novel role of Yin Yang 1 in the regulation of epithelial to mesenchymal transition in cancer via the dysregulated NF-kappaB/Snail/YY1/RKIP/PTEN Circuitry." Crit Rev Oncog **16**(3-4): 211-226.
- Borutaite, V., A. Budriunaite, et al. (2000). "Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols." Biochim Biophys Acta **1459**(2-3): 405-412.
- Bosisio, D., N. Polentarutti, et al. (2002). "Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide." Blood **99**(9): 3427-3431.

- Bowie, A. and L. A. O'Neill (2000). "Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries." Biochem Pharmacol **59**(1): 13-23.
- Bronte, V., P. Serafini, et al. (2003). "L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions." Trends Immunol **24**(6): 302-306.
- Brown, G. C. and V. Borutaite (2001). "Nitric oxide, mitochondria, and cell death." IUBMB Life **52**(3-5): 189-195.
- Bui, J. D. and R. D. Schreiber (2007). "Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?" Curr Opin Immunol **19**(2): 203-208.
- Bult, H., G. E. Boeckxstaens, et al. (1990). "Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter." Nature **345**(6273): 346-347.
- Burke, A. J., F. J. Sullivan, et al. (2013). "The yin and yang of nitric oxide in cancer progression." Carcinogenesis **34**(3): 503-512.
- Cardounel, A. J., Y. Xia, et al. (2005). "Endogenous methylarginines modulate superoxide as well as nitric oxide generation from neuronal nitric-oxide synthase: differences in the effects of monomethyl- and dimethylarginines in the presence and absence of tetrahydrobiopterin." J Biol Chem **280**(9): 7540-7549.
- Carver, J., A. Doctor, et al. (2005). "S-nitrosothiol formation." Methods Enzymol **396**: 95-105.
- Cavalli, R. C., C. J. Burke, et al. (1994). "Mutagenesis of rat liver arginase expressed in Escherichia coli: role of conserved histidines." Biochemistry **33**(35): 10652-10657.
- Cendan, J. C., D. L. Topping, et al. (1996). "Inflammatory mediators stimulate arginine transport and arginine-derived nitric oxide production in a murine breast cancer cell line." J Surg Res **60**(2): 284-288.
- Channon, K. M. (2004). "Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease." Trends Cardiovasc Med **14**(8): 323-327.
- Chaudhary, P. M., C. Ferguson, et al. (1998). "Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans." Blood **91**(11): 4020-4027.
- Chen, Z., J. Zhang, et al. (2002). "Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8306-8311.
- Chuang, T. and R. J. Ulevitch (2001). "Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells." Biochim Biophys Acta **1518**(1-2): 157-161.
- Chung, K. K., B. Thomas, et al. (2004). "S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function." Science **304**(5675): 1328-1331.
- Clague, M. J., J. S. Wishnok, et al. (1997). "Formation of N delta-cyanoornithine from NG-hydroxy-L-arginine and hydrogen peroxide by neuronal nitric oxide synthase: implications for mechanism." Biochemistry **36**(47): 14465-14473.

- Cochin, S., C. Chauleur, et al. (2008). "[Treatment of breast cancer between 1985 and 2005 at Saint-Etienne University Hospital: contribution of mammography screening. Retrospective study of 473 patients]." Gynecol Obstet Fertil **36**(2): 151-158.
- Coley, W. B. (1898). "II. The Influence of Injury upon the Development of Sarcoma." Ann Surg **27**(3): 259-284.
- Coley, W. B. (1910). "The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)." Proc R Soc Med **3**(Surg Sect): 1-48.
- Conti, P., R. A. Dempsey, et al. (1991). "Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta, tumour necrosis factor and interleukin-6. Effect of IL-1 receptor antagonist." Immunology **73**(4): 450-456.
- Cook, J. A., M. C. Krishna, et al. (1997). "Nitric oxide enhancement of melphalan-induced cytotoxicity." Br J Cancer **76**(3): 325-334.
- Corraliza, I. M., G. Soler, et al. (1995). "Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages." Biochem Biophys Res Commun **206**(2): 667-673.
- Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, et al. (1993). "Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes." Science **259**(5102): 1739-1742.
- David, H. (1988). "Rudolf Virchow and modern aspects of tumor pathology." Pathol Res Pract **183**(3): 356-364.
- de Bono, J. S., A. G. Dalglish, et al. (2000). "Phase I study of ONO-4007, a synthetic analogue of the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharide." Clin Cancer Res **6**(2): 397-405.
- Dean, A. (2008). "Primary breast cancer: risk factors, diagnosis and management." Nurs Stand **22**(40): 47-55; quiz 58, 60.
- DelaTorre, A., R. A. Schroeder, et al. (1997). "Alteration of NF-kappa B p50 DNA binding kinetics by S-nitrosylation." Biochem Biophys Res Commun **238**(3): 703-706.
- Delude, R. L., R. Savedra, Jr., et al. (1995). "CD14 enhances cellular responses to endotoxin without imparting ligand-specific recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9288-9292.
- Denicola, A., J. M. Souza, et al. (1998). "Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3566-3571.
- Di Rosa, M., M. Radomski, et al. (1990). "Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages." Biochem Biophys Res Commun **172**(3): 1246-1252.
- Dillman, R. O. (2011). "Cancer immunotherapy." Cancer Biother Radiopharm **26**(1): 1-64.
- Dinerman, J. L., T. M. Dawson, et al. (1994). "Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4214-4218.
- Domschke, C., Y. Ge, et al. (2013). "Long-term survival after adoptive bone marrow T cell therapy of advanced metastasized breast cancer: follow-up analysis of a clinical pilot trial." Cancer Immunol Immunother **62**(6): 1053-1060.



- Du, X., A. Poltorak, et al. (2000). "Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution." Eur Cytokine Netw **11**(3): 362-371.
- Dubensky, T. W., Jr. and S. G. Reed (2010). "Adjuvants for cancer vaccines." Semin Immunol **22**(3): 155-161.
- Duenas-Gonzalez, A., C. M. Isales, et al. (1997). "Expression of inducible nitric oxide synthase in breast cancer correlates with metastatic disease." Mod Pathol **10**(7): 645-649.
- Dunn, G. P., C. M. Koebel, et al. (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting." Nat Rev Immunol **6**(11): 836-848.
- Dunn, G. P., K. C. Sheehan, et al. (2005). "IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression." Cancer Res **65**(8): 3447-3453.
- Edwards, M. R., N. W. Bartlett, et al. (2009). "Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Pharmacol Ther **121**(1): 1-13.
- Enzler, T., S. Gillesen, et al. (2003). "Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer." J Exp Med **197**(9): 1213-1219.
- Feron, O., L. Belhassen, et al. (1996). "Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells." J Biol Chem **271**(37): 22810-22814.
- Fitzpatrick, B., M. Mehibel, et al. (2008). "iNOS as a therapeutic target for treatment of human tumors." Nitric Oxide **19**(2): 217-224.
- Fligger, J., J. Blum, et al. (1999). "Induction of intracellular arginase activity does not diminish the capacity of macrophages to produce nitric oxide in vitro." Immunobiology **200**(2): 169-186.
- Fluhr, H., T. Seitz, et al. (2013). "Heparins modulate the IFN-gamma-induced production of chemokines in human breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **137**(1): 109-118.
- Forrester, K., S. Ambs, et al. (1996). "Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2442-2447.
- Frevel, M. A., T. Bakheet, et al. (2003). "p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts." Mol Cell Biol **23**(2): 425-436.
- Furchgott, R. F. (1998). "Nitric oxide: from basic research on isolated blood vessels to clinical relevance in diabetes." An R Acad Nac Med (Madr) **115**(2): 317-331.
- Galanos, C., V. Lehmann, et al. (1984). "Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A." Eur J Biochem **140**(2): 221-227.
- Galanos, C., O. Luderitz, et al. (1985). "Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities." Eur J Biochem **148**(1): 1-5.
- Galluzzi, L., E. Vacchelli, et al. (2012). "Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy." Oncoimmunology **1**(5): 699-716.

- Gao, J., D. C. Morrison, et al. (1997). "An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide." J Biol Chem **272**(2): 1226-1230.
- Garay, R. P., P. Viens, et al. (2007). "Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help." Eur J Pharmacol **563**(1-3): 1-17.
- Garvey, E. P., J. A. Oplinger, et al. (1997). "1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo." J Biol Chem **272**(8): 4959-4963.
- Gauthier, N., S. Lohm, et al. (2004). "Tumour-derived and host-derived nitric oxide differentially regulate breast carcinoma metastasis to the lungs." Carcinogenesis **25**(9): 1559-1565.
- Gautier, T., C. Paul, et al. (2010). "Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression." FASEB J **24**(9): 3544-3554.
- Gill, D. J., B. C. Low, et al. (1996). "Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate the cat-2 gene of the L-arginine transporter in cultured vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **271**(19): 11280-11283.
- Gilmore, T. D. (2006). "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives." Oncogene **25**(51): 6680-6684.
- Goldring, C. E., S. Reveneau, et al. (1996). "In vivo footprinting of the mouse inducible nitric oxide synthase gene: inducible protein occupation of numerous sites including Oct and NF-IL6." Nucleic Acids Res **24**(9): 1682-1687.
- Goldring, C. E., S. Reveneau, et al. (2000). "Heat shock enhances transcriptional activation of the murine-inducible nitric oxide synthase gene." FASEB J **14**(15): 2393-2395.
- Green, L. C., D. A. Wagner, et al. (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." Anal Biochem **126**(1): 131-138.
- Griffiths, M. J., M. Messent, et al. (1993). "Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase." Br J Pharmacol **110**(3): 963-968.
- Haba-Rodriguez Jde, L., A. Gonzalez, et al. (2013). "Bevacizumab in advanced breast cancer: a new model for the assessment of activity in non-first-line treatment regimens." Anticancer Drugs **24**(9): 975-979.
- Hacker, H. and M. Karin (2006). "Regulation and function of IKK and IKK-related kinases." Sci STKE **2006**(357): re13.
- Hammoud, L., F. Xiang, et al. (2007). "Endothelial nitric oxide synthase promotes neonatal cardiomyocyte proliferation by inhibiting tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression." Cardiovasc Res **75**(2): 359-368.
- Han, J. (2006). "MyD88 beyond Toll." Nat Immunol **7**(4): 370-371.
- Hanafy, K. A., J. S. Krumenacker, et al. (2001). "NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction." Med Sci Monit **7**(4): 801-819.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

- Hashimoto, C., K. L. Hudson, et al. (1988). "The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." *Cell* **52**(2): 269-279.
- Hatada, E. N., D. Krappmann, et al. (2000). "NF-kappaB and the innate immune response." *Curr Opin Immunol* **12**(1): 52-58.
- Hattori, Y., E. B. Campbell, et al. (1994). "Argininosuccinate synthetase mRNA and activity are induced by immunostimulants in vascular smooth muscle. Role in the regeneration or arginine for nitric oxide synthesis." *J Biol Chem* **269**(13): 9405-9408.
- Hattori, Y., K. Kasai, et al. (1999). "Cationic amino acid transporter gene expression in cultured vascular smooth muscle cells and in rats." *Am J Physiol* **276**(6 Pt 2): H2020-2028.
- Hattori, Y. and N. Nakanishi (1995). "Effects of cyclosporin A and FK506 on nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in bacterial lipopolysaccharide-treated J774 macrophages." *Cell Immunol* **165**(1): 7-11.
- Hausel, P., H. Latado, et al. (2006). "Src-mediated phosphorylation regulates subcellular distribution and activity of human inducible nitric oxide synthase." *Oncogene* **25**(2): 198-206.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." *Cell* **132**(3): 344-362.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2011). "NF-kappaB in immunobiology." *Cell Res* **21**(2): 223-244.
- Hayden, M. S., A. P. West, et al. (2006). "NF-kappaB and the immune response." *Oncogene* **25**(51): 6758-6780.
- Heitmeier, M. R., A. L. Scarim, et al. (1997). "Interferon-gamma increases the sensitivity of islets of Langerhans for inducible nitric-oxide synthase expression induced by interleukin 1." *J Biol Chem* **272**(21): 13697-13704.
- Heller, R., A. Unbehauen, et al. (2001). "L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin." *J Biol Chem* **276**(1): 40-47.
- Herr, H. W., V. P. Laudone, et al. (1988). "Bacillus Calmette-Guerin therapy alters the progression of superficial bladder cancer." *J Clin Oncol* **6**(9): 1450-1455.
- Herr, H. W., D. M. Schwalb, et al. (1995). "Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial." *J Clin Oncol* **13**(6): 1404-1408.
- Hess, D. T., A. Matsumoto, et al. (2005). "Protein S-nitrosylation: purview and parameters." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 150-166.
- Hess, D. T. and J. S. Stamler (2012). "Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification." *J Biol Chem* **287**(7): 4411-4418.
- Hesse, M., M. Modolell, et al. (2001). "Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism." *J Immunol* **167**(11): 6533-6544.

- Hibbs, J. B., R. R. Taintor, et al. (1988). "Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule." Biochem Biophys Res Commun **157**(1): 87-94.
- Higa, M., N. Takasu, et al. (2004). "Nitroglycerin spray rapidly improves pain in a patient with chronic painful diabetic neuropathy." Diabet Med **21**(9): 1053-1054.
- Hoffmann, J. A. (2003). "The immune response of *Drosophila*." Nature **426**(6962): 33-38.
- Hold, G. L., C. S. Rabkin, et al. (2007). "A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors." Gastroenterology **132**(3): 905-912.
- Honda, K., A. Takaoka, et al. (2006). "Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors." Immunity **25**(3): 349-360.
- Honma, K., S. Tsuzuki, et al. (2009). "TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas." Blood **114**(12): 2467-2475.
- Howard, J. H. and K. I. Bland (2012). "Current management and treatment strategies for breast cancer." Curr Opin Obstet Gynecol **24**(1): 44-48.
- Huang, S., W. Hendriks, et al. (1993). "Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor." Science **259**(5102): 1742-1745.
- Huerta, S., S. Chilka, et al. (2008). "Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics (review)." Int J Oncol **33**(5): 909-927.
- Huisman, A., I. Vos, et al. (2002). "Anti-inflammatory effects of tetrahydrobiopterin on early rejection in renal allografts: modulation of inducible nitric oxide synthase." FASEB J **16**(9): 1135-1137.
- Hussain, S. P., G. E. Trivers, et al. (2004). "Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis." Cancer Res **64**(19): 6849-6853.
- Ikeda, H., L. J. Old, et al. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." Cytokine Growth Factor Rev **13**(2): 95-109.
- Isambert, N., P. Fumoleau, et al. (2013). "Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors." BMC Cancer **13**(1): 172.
- Isambert, N., P. Fumoleau, et al. (2013). "Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors." BMC Cancer **13**: 172.
- Jaffrey, S. R., H. Erdjument-Bromage, et al. (2001). "Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide." Nat Cell Biol **3**(2): 193-197.
- Jeannin, J. F., N. Onier, et al. (1991). "Antitumor effect of synthetic derivatives of lipid A in an experimental model of colon cancer in the rat." Gastroenterology **101**(3): 726-733.
- Jenkins, D. C., I. G. Charles, et al. (1995). "Roles of nitric oxide in tumor growth." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4392-4396.
- Jiang, Q., S. Akashi, et al. (2000). "Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B." J Immunol **165**(7): 3541-3544.

- Joly, G. A., M. Ayres, et al. (1994). "Effects of NG-methyl-L-arginine, NG-nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta." Biochem Biophys Res Commun **199**(1): 147-154.
- Jonasch, E. and F. G. Haluska (2001). "Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities." Oncologist **6**(1): 34-55.
- Jones, M. K., K. Tsugawa, et al. (2004). "Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1." Biochem Biophys Res Commun **318**(2): 520-528.
- Jouanguy, E., F. Altare, et al. (1996). "Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection." N Engl J Med **335**(26): 1956-1961.
- Jouanguy, E., S. Lamhamedi-Cherradi, et al. (1999). "A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection." Nat Genet **21**(4): 370-378.
- Jungi, T. W., H. Adler, et al. (1996). "Inducible nitric oxide synthase of macrophages. Present knowledge and evidence for species-specific regulation." Vet Immunol Immunopathol **54**(1-4): 323-330.
- Kakuda, D. K., M. J. Sweet, et al. (1999). "CAT2-mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages." Biochem J **340** ( Pt 2): 549-553.
- Kamijo, R., H. Harada, et al. (1994). "Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages." Science **263**(5153): 1612-1615.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, et al. (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7556-7561.
- Karin, M. (1999). "How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex." Oncogene **18**(49): 6867-6874.
- Kawasaki, K., S. Akashi, et al. (2000). "Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol." J Biol Chem **275**(4): 2251-2254.
- Kelleher, Z. T., A. Matsumoto, et al. (2007). "NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65." J Biol Chem **282**(42): 30667-30672.
- Kelly, M. G., A. B. Alvero, et al. (2006). "TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer." Cancer Res **66**(7): 3859-3868.
- Kiani, A., A. Tschiersch, et al. (1997). "Downregulation of the proinflammatory cytokine response to endotoxin by pretreatment with the nontoxic lipid A analog SDZ MRL 953 in cancer patients." Blood **90**(4): 1673-1683.
- Kikkawa, F., M. Kawai, et al. (1993). "Randomised study of immunotherapy with OK-432 in uterine cervical carcinoma." Eur J Cancer **29A**(11): 1542-1546.
- Kimura, H., A. Weisz, et al. (2001). "Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide." J Biol Chem **276**(3): 2292-2298.

- Kitagaki, J., Y. Yang, et al. (2009). "Nitric oxide prodrug JS-K inhibits ubiquitin E1 and kills tumor cells retaining wild-type p53." Oncogene **28**(4): 619-624.
- Kleinert, H., A. Pautz, et al. (2004). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 255-266.
- Kleinert, H., P. M. Schwarz, et al. (2003). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." Biol Chem **384**(10-11): 1343-1364.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." Biochem J **298** ( Pt 2): 249-258.
- Koegl, M., T. Hoppe, et al. (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." Cell **96**(5): 635-644.
- Kohnen, S. L., A. A. Mouithys-Mickalad, et al. (2001). "Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite or oxoferryl species occurs by a radical pathway." Free Radic Res **35**(6): 709-721.
- Kone, B. C., T. Kunczewicz, et al. (2003). "Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide." Am J Physiol Renal Physiol **285**(2): F178-190.
- Kornberg, M. D., N. Sen, et al. (2010). "GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins." Nat Cell Biol **12**(11): 1094-1100.
- Kuhn, D. M. and T. J. Geddes (2003). "Tetrahydrobiopterin prevents nitration of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite and nitrogen dioxide." Mol Pharmacol **64**(4): 946-953.
- Kuzkaya, N., N. Weissmann, et al. (2003). "Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **278**(25): 22546-22554.
- Lagadec, P., J. F. Jeannin, et al. (1987). "Treatment with endotoxins of peritoneal carcinomatosis induced by colon tumor cells in the rat." Invasion Metastasis **7**(2): 83-95.
- Laine, A., I. Topisirovic, et al. (2006). "Regulation of p53 localization and activity by Ubc13." Mol Cell Biol **26**(23): 8901-8913.
- Lamm, D. L., D. E. Thor, et al. (1981). "BCG immunotherapy of bladder cancer: inhibition of tumor recurrence and associated immune responses." Cancer **48**(1): 82-88.
- Lauretti, G. R., M. V. Perez, et al. (2002). "Double-blind evaluation of transdermal nitroglycerine as adjuvant to oral morphine for cancer pain management." J Clin Anesth **14**(2): 83-86.
- Laval, F. and D. A. Wink (1994). "Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase." Carcinogenesis **15**(3): 443-447.
- Le, X., D. Wei, et al. (2005). "Nitric oxide synthase II suppresses the growth and metastasis of human cancer regardless of its up-regulation of protumor factors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8758-8763.
- Lechner, M., P. Lirk, et al. (2005). "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin." Semin Cancer Biol **15**(4): 277-289.

- Lee, K. S., D. K. Lee, et al. (2012). "Differential effects of substrate-analogue inhibitors on nitric oxide synthase dimerization." Biochem Biophys Res Commun **418**(1): 49-55.
- Leesar, M. A., M. F. Stoddard, et al. (2001). "Delayed preconditioning-mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty." Circulation **103**(24): 2935-2941.
- Lejeune, P., P. Lagadec, et al. (1994). "Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression." J Immunol **152**(10): 5077-5083.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-983.
- Leon-Bollotte, L., S. Subramaniam, et al. (2011). "S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells." Gastroenterology **140**(7): 2009-2018, 2018 e2001-2004.
- Li, H. and T. L. Poulos (2005). "Structure-function studies on nitric oxide synthases." J Inorg Biochem **99**(1): 293-305.
- Li, X. and G. R. Stark (2002). "NF-kappaB-dependent signaling pathways." Exp Hematol **30**(4): 285-296.
- Libermann, T. A. and D. Baltimore (1990). "Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor." Mol Cell Biol **10**(5): 2327-2334.
- Lima-Junior, R. C., A. A. Figueiredo, et al. (2012). "Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation." Cancer Chemother Pharmacol **69**(4): 931-942.
- Lin, C. F., C. C. Tsai, et al. (2008). "IFN-gamma synergizes with LPS to induce nitric oxide biosynthesis through glycogen synthase kinase-3-inhibited IL-10." J Cell Biochem **105**(3): 746-755.
- Liu, J., A. Hamrouni, et al. (2007). "Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway." Blood **110**(1): 296-304.
- Liu, S. and Z. J. Chen (2011). "Expanding role of ubiquitination in NF-kappaB signaling." Cell Res **21**(1): 6-21.
- Loehe, F., G. Preissler, et al. (2004). "Continuous infusion of nitroglycerin improves pulmonary graft function of non-heart-beating donor lungs." Transplantation **77**(12): 1803-1808.
- Lorsbach, R. B., W. J. Murphy, et al. (1993). "Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide." J Biol Chem **268**(3): 1908-1913.
- Lowenstein, C. J., J. L. Dinerman, et al. (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger." Ann Intern Med **120**(3): 227-237.
- Ma, A. and E. Turer (2006). "E2 enzymes: expanding the 'ubi-verse' of immune signaling." Nat Immunol **7**(9): 903-904.

- Maehara, Y., T. Okuyama, et al. (1994). "Postoperative immunochemotherapy including streptococcal lysate OK-432 is effective for patients with gastric cancer and serosal invasion." Am J Surg **168**(1): 36-40.
- Maitra, S. K., M. C. Schotz, et al. (1978). "Determination of lipid A and endotoxin in serum by mass spectroscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(8): 3993-3997.
- Martinez Guisado, A., A. Sanchez Munoz, et al. (2011). "Initialization of adjuvant hormonal treatment for breast cancer." Adv Ther **28 Suppl 6**: 66-84.
- Martinka, S. and L. A. Bruggeman (2006). "Persistent NF-kappaB activation in renal epithelial cells in a mouse model of HIV-associated nephropathy." Am J Physiol Renal Physiol **290**(3): F657-665.
- McCall, T. B., R. M. Palmer, et al. (1991). "Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone." Eur J Immunol **21**(10): 2523-2527.
- McPherson, K., C. M. Steel, et al. (2000). "ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics." BMJ **321**(7261): 624-628.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-397.
- Metzen, E. and P. J. Ratcliffe (2004). "HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing." Biol Chem **385**(3-4): 223-230.
- Mignot, L. and F. Morvan (1996). "[Pregnancy after breast cancer]." Contracept Fertil Sex **24**(4): 319-321.
- Millet, A., A. Bettaieb, et al. (2002). "Influence of the nitric oxide donor glyceryl trinitrate on apoptotic pathways in human colon cancer cells." Gastroenterology **123**(1): 235-246.
- Minc-Golomb, D. and J. P. Schwartz (1994). "Expression of constitutive nitric oxide synthase in a primary neuronal culture." Neuroreport **5**(12): 1466-1468.
- Misko, T. P., M. K. Highkin, et al. (1998). "Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts." J Biol Chem **273**(25): 15646-15653.
- Mita, Y., K. Dobashi, et al. (2001). "Toll-like receptor 2 and 4 surface expressions on human monocytes are modulated by interferon-gamma and macrophage colony-stimulating factor." Immunol Lett **78**(2): 97-101.
- Mochizuki, S., M. Kobayashi, et al. (2004). "Gamma-interferon enhances expression of CD14/MyD88 and subsequent responsiveness to lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human gingival fibroblasts." J Periodontal Res **39**(5): 333-343.
- Mogensen, T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." Clin Microbiol Rev **22**(2): 240-273, Table of Contents.
- Mohr, S., J. S. Stamler, et al. (1994). "Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents." FEBS Lett **348**(3): 223-227.
- Moore, W. M., R. K. Webber, et al. (1994). "L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase." J Med Chem **37**(23): 3886-3888.



- Munder, M., K. Eichmann, et al. (1999). "Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells." J Immunol **163**(7): 3771-3777.
- Musial, A. and N. T. Eissa (2001). "Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway." J Biol Chem **276**(26): 24268-24273.
- Nakamura, T., L. Wang, et al. (2010). "Transnitrosylation of XIAP regulates caspase-dependent neuronal cell death." Mol Cell **39**(2): 184-195.
- Nalepa, G., M. Rolfe, et al. (2006). "Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system." Nat Rev Drug Discov **5**(7): 596-613.
- Nazarewicz, R. R., W. J. Zenebe, et al. (2007). "Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase." Cancer Res **67**(3): 1282-1290.
- Ni, C., P. Wu, et al. (2013). "IFN-gamma selectively exerts pro-apoptotic effects on tumor-initiating label-retaining colon cancer cells." Cancer Lett **336**(1): 174-184.
- Nicholson, B., C. K. Manner, et al. (2001). "Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2." J Biol Chem **276**(19): 15881-15885.
- Nicolas, A., D. Cathelin, et al. (2007). "Dendritic cells trigger tumor cell death by a nitric oxide-dependent mechanism." J Immunol **179**(2): 812-818.
- O'Connor, K. J. and S. Moncada (1991). "Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase and the related cell damage in adenocarcinoma cells." Biochim Biophys Acta **1097**(3): 227-231.
- Obermeier, F., G. Kojouharoff, et al. (1999). "Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice." Clin Exp Immunol **116**(2): 238-245.
- Ohashi, K., V. Burkart, et al. (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." J Immunol **164**(2): 558-561.
- Okada, D. (1998). "Tetrahydrobiopterin-dependent stabilization of neuronal nitric oxide synthase dimer reduces susceptibility to phosphorylation by protein kinase C in vitro." FEBS Lett **434**(3): 261-264.
- Olsson, N. O., A. Leclerc, et al. (1982). "A simple photometric microassay for the quantitative evaluation of macrophage-mediated cytotoxicity on adherent cancer cells." Ann Immunol (Paris) **133D**(3): 245-254.
- Onier, N., S. Hilpert, et al. (1999). "Cure of colon cancer metastasis in rats with the new lipid A OM 174. Apoptosis of tumor cells and immunization of rats." Clin Exp Metastasis **17**(4): 299-306.
- Onier, N., S. Hilpert, et al. (1999). "Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats." Int J Cancer **81**(5): 755-760.
- Pacher, P. and C. Szabo (2007). "Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors." Cardiovasc Drug Rev **25**(3): 235-260.

- Palazzolo-Ballance, A. M., C. Suquet, et al. (2007). "Pathways for intracellular generation of oxidants and tyrosine nitration by a macrophage cell line." Biochemistry **46**(25): 7536-7548.
- Pall, M. L. (2007). "Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO/ONOO- cycle." Med Hypotheses **69**(4): 821-825.
- Panaretakis, T., N. Joza, et al. (2008). "The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death." Cell Death Differ **15**(9): 1499-1509.
- Panier, S. and D. Durocher (2009). "Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks." DNA Repair (Amst) **8**(4): 436-443.
- Park, H. S., J. S. Mo, et al. (2006). "Nitric oxide inhibits an interaction between JNK1 and c-Jun through nitrosylation." Biochem Biophys Res Commun **351**(1): 281-286.
- Park, H. S., J. W. Yu, et al. (2004). "Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 by nitric oxide through a thiol redox mechanism." J Biol Chem **279**(9): 7584-7590.
- Parlesak, A. and C. Bode (1995). "Lipopolysaccharide determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography after fluorescence labeling." J Chromatogr A **711**(2): 277-288.
- Parr, I., E. Wheeler, et al. (1973). "Similarities of the anti-tumour actions of endotoxin, lipid A and double-stranded RNA." Br J Cancer **27**(5): 370-389.
- Petroski, M. D. (2008). "The ubiquitin system, disease, and drug discovery." BMC Biochem **9** **Suppl 1**: S7.
- Pickart, C. M. and D. Fushman (2004). "Polyubiquitin chains: polymeric protein signals." Curr Opin Chem Biol **8**(6): 610-616.
- Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." Nat Rev Immunol **5**(5): 375-386.
- Pollara, G., M. E. Handley, et al. (2006). "Autocrine type I interferon amplifies dendritic cell responses to lipopolysaccharide via the nuclear factor-kappaB/p38 pathways." Scand J Immunol **63**(3): 151-154.
- Prevotat, L., R. Filomenko, et al. (2006). "Nitric oxide-induced down-regulation of beta-catenin in colon cancer cells by a proteasome-independent specific pathway." Gastroenterology **131**(4): 1142-1152.
- Qian, J., F. Chen, et al. (2012). "Nitric oxide reduces NADPH oxidase 5 (Nox5) activity by reversible S-nitrosylation." Free Radic Biol Med **52**(9): 1806-1819.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, et al. (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." J Exp Med **189**(4): 615-625.
- Radi, R. (2004). "Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4003-4008.
- Radi, R., T. P. Cosgrove, et al. (1993). "Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence." Biochem J **290** ( Pt 1): 51-57.
- Radomski, M. W., R. M. Palmer, et al. (1990). "Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 10043-10047.

- Raman, C. S., H. Li, et al. (1998). "Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center." Cell **95**(7): 939-950.
- Rees, D. D., R. M. Palmer, et al. (1990). "Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo." Br J Pharmacol **101**(3): 746-752.
- Reveneau, S., T. G. Petrakis, et al. (2012). "Oct-1 cooperates with the TATA binding initiation complex to control rapid transcription of human iNOS." Cell Mol Life Sci **69**(15): 2609-2619.
- Reynaert, N. L., K. Ckless, et al. (2004). "Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(24): 8945-8950.
- Rock, F. L., G. Hardiman, et al. (1998). "A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 588-593.
- Rockwell, S. C., R. F. Kallman, et al. (1972). "Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor and its tissue-culture-adapted derivative." J Natl Cancer Inst **49**(3): 735-749.
- Rodriguez, P. C., A. H. Zea, et al. (2003). "L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes." J Immunol **171**(3): 1232-1239.
- Rudders, S., J. Gaspar, et al. (2001). "ESE-1 is a novel transcriptional mediator of inflammation that interacts with NF-kappa B to regulate the inducible nitric-oxide synthase gene." J Biol Chem **276**(5): 3302-3309.
- Sakamoto, K. and S. Maeda (2010). "Targeting NF-kappaB for colorectal cancer." Expert Opin Ther Targets **14**(6): 593-601.
- Salaun, C., J. Greaves, et al. (2010). "The intracellular dynamic of protein palmitoylation." J Cell Biol **191**(7): 1229-1238.
- Saura, M., R. Martinez-Dalmau, et al. (1996). "Interleukin-13 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in human mesangial cells." Biochem J **313** ( Pt 2): 641-646.
- Schmitt, H. P. (2006). "Protein ubiquitination, degradation and the proteasome in neuro-degenerative disorders: no clear evidence for a significant pathogenetic role of proteasome failure in Alzheimer disease and related disorders." Med Hypotheses **67**(2): 311-317.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, et al. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-189.
- Schroder, K., M. J. Sweet, et al. (2006). "Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages." Immunobiology **211**(6-8): 511-524.
- Selemidis, S., G. J. Dusting, et al. (2007). "Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells." Cardiovasc Res **75**(2): 349-358.
- Sennequier, N. and D. J. Stuehr (1996). "Analysis of substrate-induced electronic, catalytic, and structural changes in inducible NO synthase." Biochemistry **35**(18): 5883-5892.

- Seth, D. and J. S. Stamler (2011). "The SNO-proteome: causation and classifications." Curr Opin Chem Biol **15**(1): 129-136.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-1111.
- Shi, Q., Q. Xiong, et al. (2000). "Influence of nitric oxide synthase II gene disruption on tumor growth and metastasis." Cancer Res **60**(10): 2579-2583.
- Shiva, S., P. S. Brookes, et al. (2001). "Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7212-7217.
- Siemens, D. R., J. P. Heaton, et al. (2009). "Phase II study of nitric oxide donor for men with increasing prostate-specific antigen level after surgery or radiotherapy for prostate cancer." Urology **74**(4): 878-883.
- Siemens, D. R., N. Hu, et al. (2008). "Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide." Cancer Res **68**(12): 4746-4753.
- Simmons, W. W., D. Ungureanu-Longrois, et al. (1996). "Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport." J Biol Chem **271**(39): 23928-23937.
- Skaug, B., X. Jiang, et al. (2009). "The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways." Annu Rev Biochem **78**: 769-796.
- Smith, H. A. and Y. Kang (2013). "The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells." J Mol Med (Berl) **91**(4): 411-429.
- Souza, J. M., I. Choi, et al. (2000). "Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins." Arch Biochem Biophys **380**(2): 360-366.
- Stamler, J. S., D. J. Singel, et al. (1992). "Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms." Science **258**(5090): 1898-1902.
- Staudt, L. M. (2010). "Oncogenic activation of NF-kappaB." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(6): a000109.
- Steinman, R. M. and M. D. Witmer (1978). "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 5132-5136.
- Strausser, H. R. and L. A. Bober (1972). "Inhibition of tumor growth and survival of aged mice inoculated with Moloney tumor transplants and treated with endotoxin." Cancer Res **32**(10): 2156-2159.
- Street, S. E., J. A. Trapani, et al. (2002). "Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma." J Exp Med **196**(1): 129-134.
- Stubauer, G., A. Giuffre, et al. (1999). "Mechanism of S-nitrosothiol formation and degradation mediated by copper ions." J Biol Chem **274**(40): 28128-28133.
- Sun, D. and A. Ding (2006). "MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA." Nat Immunol **7**(4): 375-381.

- Sun, J., L. J. Druhan, et al. (2010). "Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production." Arch Biochem Biophys **494**(2): 130-137.
- Suzuki, N., S. Suzuki, et al. (2003). "IL-1R-associated kinase 4 is required for lipopolysaccharide-induced activation of APC." J Immunol **171**(11): 6065-6071.
- Syed, N. A., P. L. Andersen, et al. (2006). "Uev1A, a ubiquitin conjugating enzyme variant, inhibits stress-induced apoptosis through NF-kappaB activation." Apoptosis **11**(12): 2147-2157.
- Sylvester, R. J., M. A. van der, et al. (2002). "Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials." J Urol **168**(5): 1964-1970.
- Szajnik, M., M. J. Szczepanski, et al. (2009). "TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer." Oncogene **28**(49): 4353-4363.
- Takai, N., M. Kataoka, et al. (1997). "Primary structure of rat CD14 and characteristics of rat CD14, cytokine, and NO synthase mRNA expression in mononuclear phagocyte system cells in response to LPS." J Leukoc Biol **61**(6): 736-744.
- Takayama, K., E. Ribi, et al. (1981). "Isolation of a nontoxic lipid A fraction containing tumor regression activity." Cancer Res **41**(7): 2654-2657.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-451.
- Takeuchi, O., T. Kawai, et al. (1999). "TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family." Gene **231**(1-2): 59-65.
- Tamai, R., S. Sugawara, et al. (2003). "Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon-gamma in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression." J Endotoxin Res **9**(3): 145-153.
- Tauriello, D. V., A. Haegbarth, et al. (2010). "Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/beta-catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl." Mol Cell **37**(5): 607-619.
- Taylor, K. R., J. M. Trowbridge, et al. (2004). "Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4." J Biol Chem **279**(17): 17079-17084.
- Taylor, K. R., K. Yamasaki, et al. (2007). "Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2." J Biol Chem **282**(25): 18265-18275.
- Tillou, X., G. Raynal, et al. (2008). "[Carcinoma in situ in bladder and urethra among renal transplanted patient: failure of BCG therapy]." Prog Urol **18**(13): 1097-1099.
- Toda, N., K. Ayajiki, et al. (2009). "Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase." J Hypertens **27**(10): 1929-1940.

- Toda, N. and T. Okamura (1992). "[Neurotransmission and nitric oxide (NO)]." Nihon Yakurigaku Zasshi **100**(3): 173-182.
- Tong, X., S. Zheng, et al. (2007). "Triptolide inhibits cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human colon cancer and leukemia cells." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **39**(2): 89-95.
- Topisirovic, I., G. J. Gutierrez, et al. (2009). "Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12676-12681.
- Tsang, A. H., Y. I. Lee, et al. (2009). "S-nitrosylation of XIAP compromises neuronal survival in Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4900-4905.
- Turko, I. V. and F. Murad (2002). "Protein nitration in cardiovascular diseases." Pharmacol Rev **54**(4): 619-634.
- Uteperbergenov, D. I., V. V. Khramtsov, et al. (1995). "Kinetics of nitric oxide liberation by 3,4-dihydro-1,2-diazete 1,2-dioxides and their vasodilatory properties in vitro and in vivo." Biochem Biophys Res Commun **214**(3): 1023-1032.
- Vallance, P. and J. Leiper (2002). "Blocking NO synthesis: how, where and why?" Nat Rev Drug Discov **1**(12): 939-950.
- van Duin, D., R. Medzhitov, et al. (2006). "Triggering TLR signaling in vaccination." Trends Immunol **27**(1): 49-55.
- Vanden Hoek, T. L., C. Li, et al. (1997). "Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion." J Mol Cell Cardiol **29**(9): 2571-2583.
- Vasquez-Vivar, J., N. Hogg, et al. (1999). "Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase." J Biol Chem **274**(38): 26736-26742.
- Vasquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, et al. (1998). "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9220-9225.
- Vilcek, J. (2003). "Novel interferons." Nat Immunol **4**(1): 8-9.
- Watson, J. and R. Riblet (1974). "Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides." J Exp Med **140**(5): 1147-1161.
- Wei, D., E. L. Richardson, et al. (2003). "Direct demonstration of negative regulation of tumor growth and metastasis by host-inducible nitric oxide synthase." Cancer Res **63**(14): 3855-3859.
- Weil, R. and A. Israel (2006). "Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB." Cell Death Differ **13**(5): 826-833.
- Weiner, A. M., M. L. Allende, et al. (2009). "Zebrafish cnbp intron1 plays a fundamental role in controlling spatiotemporal gene expression during embryonic development." J Cell Biochem **108**(6): 1364-1375.
- Weiner, L. M., M. V. Dhodapkar, et al. (2009). "Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy." Lancet **373**(9668): 1033-1040.

- Weissman, A. M., N. Shabek, et al. (2011). "The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(9): 605-620.
- Wells, S. M. and A. Holian (2007). "Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **36**(5): 520-528.
- Wenzel, D. M., K. E. Stoll, et al. (2011). "E2s: structurally economical and functionally replete." Biochem J **433**(1): 31-42.
- Wink, D. A., J. A. Cook, et al. (1997). "Nitric oxide and some nitric oxide donor compounds enhance the cytotoxicity of cisplatin." Nitric Oxide **1**(1): 88-94.
- Wink, D. A., K. S. Kasprzak, et al. (1991). "DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors." Science **254**(5034): 1001-1003.
- Wiseman, H. and B. Halliwell (1996). "Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer." Biochem J **313** ( Pt 1): 17-29.
- Wood, P. J., I. J. Stratford, et al. (1993). "Modification of energy metabolism and radiation response of a murine tumour by changes in nitric oxide availability." Biochem Biophys Res Commun **192**(2): 505-510.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, et al. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science **249**(4975): 1431-1433.
- Wu-Baer, F., K. Lagazon, et al. (2003). "The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin." J Biol Chem **278**(37): 34743-34746.
- Wu, G. and S. M. Morris, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." Biochem J **336** ( Pt 1): 1-17.
- Wu, G., A. Wong, et al. (1998). "Phosphorylation changes the spatial relationship between Glu124-Arg143 and Cys18 and Cys165 of the regulatory light chain in smooth muscle myosin." Biochemistry **37**(21): 7676-7685.
- Wu, X., M. Yamamoto, et al. (2009). "Regulation of hematopoiesis by the K63-specific ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(49): 20836-20841.
- Wu, Y., S. Antony, et al. (2011). "Up-regulation and sustained activation of Stat1 are essential for interferon-gamma (IFN-gamma)-induced dual oxidase 2 (Duox2) and dual oxidase A2 (DuoxA2) expression in human pancreatic cancer cell lines." J Biol Chem **286**(14): 12245-12256.
- Xia, Y., L. J. Roman, et al. (1998). "Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain." J Biol Chem **273**(35): 22635-22639.
- Xia, Y., A. L. Tsai, et al. (1998). "Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process." J Biol Chem **273**(40): 25804-25808.

- Xia, Y. and J. L. Zweier (1997). "Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6954-6958.
- Xie, J., J. Kolls, et al. (1995). "Independent suppression of nitric oxide and TNF alpha in the lung of conscious rats by ethanol." FASEB J **9**(2): 253-261.
- Xie, K., S. Huang, et al. (1993). "Cytokine-induced apoptosis in transformed murine fibroblasts involves synthesis of endogenous nitric-oxide." Int J Oncol **3**(6): 1043-1048.
- Yamada, H., M. A. Odonnell, et al. (2005). "Interferon-gamma up-regulates toll-like receptor 4 and cooperates with lipopolysaccharide to produce macrophage-derived chemokine and interferon-gamma inducible protein-10 in human bladder cancer cell line RT4." J Urol **174**(3): 1119-1123.
- Yamamoto, M., T. Okamoto, et al. (2006). "Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling." Nat Immunol **7**(9): 962-970.
- Yamamuro, M., T. Sato, et al. (1975). "[Pain after trigeminal nerve block]." Masui **24**(9): 908-913.
- Yang, D., Y. V. Postnikov, et al. (2012). "High-mobility group nucleosome-binding protein 1 acts as an alarmin and is critical for lipopolysaccharide-induced immune responses." J Exp Med **209**(1): 157-171.
- Yang, L., C. Lan, et al. (2013). "Sodium nitroprusside (SNP) sensitizes human gastric cancer cells to TRAIL-induced apoptosis." Int Immunopharmacol **17**(2): 383-389.
- Yao, D., Z. Gu, et al. (2004). "Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10810-10814.
- Yasuda, H., M. Yamaya, et al. (2006). "Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **24**(4): 688-694.
- Yusuf, N., T. H. Nasti, et al. (2008). "Antagonistic roles of CD4+ and CD8+ T-cells in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene cutaneous carcinogenesis." Cancer Res **68**(10): 3924-3930.
- Zhang, Y., V. Brovkovich, et al. (2007). "Dynamic receptor-dependent activation of inducible nitric-oxide synthase by ERK-mediated phosphorylation of Ser745." J Biol Chem **282**(44): 32453-32461.



## COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES

- Myriam LAMRANI\*, Néjia SASSI\*, Cédric SEIGNEZ, Nolwenn GAUTHIER, Ali BETTAIEB, Catherine PAUL, Jean-François JEANNIN. « Implication du monoxyde d'azote dans l'effet anti-tumoral d'un analogue de lipide A, l'OM-174 », Forum des Jeunes Chercheurs, 7-8 juin 2010, Besançon, France
- Myriam LAMRANI\*, Néjia SASSI\*, Cédric SEIGNEZ, Nolwenn GAUTHIER, Ali BETTAIEB, Catherine PAUL, Jean-François JEANNIN. « Implication of nitric oxide in anti-tumor effect of a derivative lipid A, OM-174 », Congrès 2009 du club NO, 22-23 octobre 2009, Paris, France
- Myriam LAMRANI\*, Géraldine LUCCHI, Patrick DUCOUROY, Jean-François JEANNIN Ali BETTAIEB, « Analyse protéomique de la S-Nitrosylation dans l'effet anti-tumoral d'un analogue de lipide A, l'OM-174 », Journée Scientifique de l'IFR100, 13 avril 2011, Dijon, France
- Myriam LAMRANI, Géraldine LUCCHI, Patrick DUCOUROY, Jean-François JEANNIN Ali BETTAIEB, « Analyse protéomique de la S-Nitrosylation dans l'effet anti-tumoral d'un analogue de lipide A, l'OM-174 » », Forum des Jeunes Chercheurs, 16-17 juin 2011, Dijon, France
- Myriam LAMRANI, Géraldine LUCCHI, Patrick DUCOUROY, Jean-François JEANNIN Ali BETTAIEB, « Proteomic analysis of S-nitrosylation in the antitumor effect of a lipid A analogue, OM-174 », SMAP (Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique), 19-22 septembre 2011, Avignon, France
- Myriam LAMRANI, Néjia SASSI, Ali BETTAIEB, Catherine PAUL, Jean-François JEANNIN « Implication of nitric oxide (NO) in tumor regression in a murine breast cancer model », 1<sup>st</sup> International Congress on Cell Death in Cancer, 13-16 mai 2012, Saint-Malo, France

# PUBLICATIONS

L. LEON-BOLLOTTE, M. LAMRANI, S. PLENCHETTE-COLAS, J-F JEANNIN, A. BETTAIEB.  
Post-Translational Regulation of Fas/CD95 in Cell Death and Survival: Role of Nitric Oxide. Forum  
on Immunopathological Diseases and Therapeutics. 2010 v1.i4



**IMPRIM' SERVICE**  
90, rue de Mirande  
21000 DIJON  
Tél & Fax: 03 80 65 30 74